

## **INFORMATION TO USERS**

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.** Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

Bell & Howell Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600

**UMI<sup>®</sup>**

Université de Sherbrooke

Caractérisation des récepteurs de la cholécystokinine  
au cours du développement pancréatique

par

**Judith Bourassa**

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire  
Service de Gastroentérologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire

Août 2000



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56870-9

Canada

À mes parents

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>IX</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>XIII</b>
<b>CHAPITRE I INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 LE PANCRÉAS : PHYSIOLOGIE ET HISTOLOGIE.....	1
1.2 MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA SÉCRÉTION PANCRÉATIQUE.....	5
1.3 MÉCANISMES NERVEUX.....	7
1.4 MÉCANISMES HORMONAUX.....	12
1.4.1 LA CHOLÉCYSTOKININE.....	13
1.4.2 LA GASTRINE.....	15
1.4.3 LES RÉCEPTEURS À CHOLÉCYSTOKININE ET À GASTRINE.....	18
1.4.3.1 CARACTÉRISATION DES RÉCEPTEURS À CCK....	20
1.4.3.2 MÉCANISMES DE TRANSDUCTION.....	25
1.4.3.3 HÉTÉROGÉNÉITÉ INTER-ESPÈCES DES RÉCEPTEURS À CCK.....	28

1.4.4	NOUVEAUX RÉCEPTEURS À CCK.....	30
1.4.5	MUTANTS NATURELS ET ANIMAUX TRANSGÉNIQUES.....	33
1.4.8	SOURIS TRANSGÉNIQUE : EXPRESSION DU CCK <sub>B</sub> HUMAIN.....	35
1.4.9	SOURIS 'KNOCKOUT' : DÉFICIENCE EN CCK <sub>B</sub> .....	37
1.5	OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE.....	38
<b>CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>		<b>40</b>
2.1	Animaux.....	40
2.2	Méthodologie.....	41
2.2.1	Sacrifice et prélèvement.....	41
2.2.2	Extraction des ARNs totaux.....	42
2.2.3	Quantification et contrôle de qualité de l'ARN.....	44
2.2.4	Transfert de l'ARN sur membrane de nylon.....	45
2.2.5	Analyse par buvardage Northern .....	46
2.2.5.1	Préparation des sondes.....	47
2.2.5.2	Description des sondes.....	47
2.2.5.3	Synthèse des sondes.....	49
2.2.5.4	Préhybridation, hybridation, lavages et exposition.....	51

2.2.6	Amplification d'ADN.....	52
2.2.7	Extraction, fractionnement et dosage des protéines.....	53
2.2.8	Migration et transfert des protéines.....	53
2.2.9	Analyse par buvardage Western et Immunoneutralisation.....	55
2.2.9.1	Description des Anticorps primaires.....	56
2.2.10	Immunofluorescence indirecte.....	57
 <b>CHAPITRE III RÉSULTATS.....</b>		<b>59</b>
3.1	Expression du récepteur CCK <sub>A</sub> .....	59
3.1.1	Ontogénie de l'expression du récepteur CCK <sub>A</sub> dans le pancréas de rat.....	59
3.1.2	Expression du récepteur CCK <sub>A</sub> dans le pancréas de souris, de porc et de fœtus humain. ....	64
3.2	Expression du récepteur CCK <sub>B</sub> .....	68
3.2.1	Ontogénie de l'expression du récepteur CCK <sub>B</sub> dans le pancréas de rat.....	68
3.2.2	Expression du récepteur CCK <sub>B</sub> dans le pancréas de souris, de porc et de foetus humain.....	75
3.3	Expression de la gastrine pancréatique.....	81
3.3.1	Ontogénie de l'expression de la gastrine pancréatique de rat.....	81

<b>CHAPITRE IV DISCUSSION.....</b>	<b>84</b>
LE RÉCEPTEUR CCK <sub>A</sub> .....	84
LE RÉCEPTEUR CCK <sub>B</sub> .....	89
<b>CHAPITRE V CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>101</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>112</b>



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Régulation hormonale de la sécrétion pancréatique exocrine.....	12
Tableau 2	Actions biologiques de la gastrine. ....	17
Tableau 3	Affinités et profils de liaison des récepteurs CCK <sub>A</sub> et CCK <sub>B</sub> pour différents agonistes & antagonistes.....	21
Tableau 4	Effets inhibiteurs de la somatostatine sur le système gastroentéropancréatique. ....	106

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure anatomique, localisation physique et anatomie de surface du pancréas humain : une glande mixte.....	3
Figure 2	Analyse par Northern de l'expression du récepteur CCK <sub>A</sub> du pancréas de rat.....	60
Figure 3	Analyse par Western de l'expression du récepteur CCK <sub>A</sub> du pancréas de rat.....	61
Figure 4	Immunofluorescence indirecte du récepteur CCK <sub>A</sub> au cours du développement pancréatique de rat. ....	63
Figure 5	Analyse par Western du récepteur CCK <sub>A</sub> du pancréas de souris (A), de porc (B) et de fœtus humain (20 semaines) (C).....	65
Figure 6	Immunofluorescence indirecte du récepteur CCK <sub>A</sub> du pancréas de souris (A), de porc (B) et de fœtus humain (20 semaines) (C). ....	67
Figure 7	Analyse par Northern de l'expression du récepteur CCK <sub>B</sub> du pancréas de rat. ....	69
Figure 8	Analyse par Western de l'expression du récepteur CCK <sub>B</sub> du pancréas de rat et localisation dans la glande gastrique.....	71

Figure 9	Immunofluorescence indirecte du récepteur CCK <sub>B</sub> au cours du développement pancréatique de rat.....	72
Figure 10	Colocalisation par immunofluorescence indirecte du récepteur CCK <sub>B</sub> pancréatique de rat avec différents marqueurs du pancréas endocrine.....	74
Figure 11	Analyse par Western et immunofluorescence du récepteur CCK <sub>B</sub> pancréatique de souris (A), de porc (B) et de fœtus humain (20 semaines) (C).....	76
Figure 12	Colocalisation par immunofluorescence indirecte du récepteur CCK <sub>B</sub> pancréatique de souris avec différents marqueurs du pancréas endocrine. ....	78
Figure 13	Colocalisation par immunofluorescence indirecte du récepteur CCK <sub>B</sub> pancréatique de porc avec différents marqueurs du pancréas endocrine. ....	79
Figure 14	Colocalisation par immunofluorescence indirecte du récepteur CCK <sub>B</sub> pancréatique fœtal humain (20 semaines) avec différents marqueurs du pancréas endocrine.....	80
Figure 15	Analyse par Northern de l'expression de la gastrine pancréatique de rat. ....	82
Figure 16	Immunofluorescence indirecte de la gastrine de l'antre pylorique et du pancréas de rat.....	83

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\alpha$	alpha
$\beta$	béta
$\delta$	delta
Ach	acétylcholine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNc	acide ribonucléique complémentaire
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
CCK	cholécystokinine
CCK <sub>A</sub>	récepteur de la cholécystokinine de type A
CCK <sub>B</sub>	récepteur de la cholécystokinine de type B
CCK <sub>C</sub>	récepteur de la cholécystokinine de type C
CGRP	'calcitonine gene related peptide'
CTP	cytosine triphosphate
DAG	diacylglycérol
DEPC	diéthylpyrocarbonate
ECL	'enterochromaffin-like'

ERK	‘extracellular signal regulated kinase’
Fak	‘focal adhesion kinase’
GRP	‘gastrin-releasing peptide’
GTP	guanine triphosphate
IP <sub>3</sub>	inositol triphosphate
JNK	‘janus kinase’
Kb	kilobase
MAPK	‘mitogen-activated protein kinase’
NPY	neuropeptide Y
PACAP	‘pituitary adenylate cyclase-activating peptide’
pb	paire de base
PCR	‘polymerase chain reaction’
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol diphosphate
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PP	polypeptide pancréatique
RT-PCR	‘reverse transcriptase polymerase chain reaction’
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate ‘polyacrylamide gel electrophoresis’
S.P.I.	sérum préimmun
SS	somatostatine

TTP	thymine triphosphate
UTP	uracyl triphosphate
VIP	'vasoactive intestinal peptide'

Les résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet de deux publications :

**BOURASSA, J., LAINÉ, J., KRUSE, M.-L., GAGNON, M.-C., CALVO, É. ET J. MORISSET (1999).** Ontogeny and species differences in the pancreatic expression and localisation of the CCK<sub>A</sub> receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260 :820-828.

**MORISSET, J., WONG, H., WALSH, J.H., LAINÉ, J. ET J. BOURASSA (2000).** The pancreatic CCK<sub>B</sub> receptors : their potential roles in somatostatin release and delta cells proliferation. *Am. J. Physiol.* 279 :G148-G156.

## RÉSUMÉ

La cholécystokinine (CCK) et la gastrine font partie d'une famille de peptides qui régule, à titre d'hormones et / ou de neurotransmetteurs, une variété de fonctions physiologiques importantes tout le long du tractus digestif et du système nerveux central. Sur une base pharmacologique et moléculaire, ces peptides médient leurs actions par le biais de récepteurs à sept domaines transmembranaires (7DTMs) couplés à des protéines G, soit les récepteurs CCK<sub>A</sub> et CCK<sub>B</sub>. Ces derniers se distinguent sur la base de leur affinité et de leur profil respectifs de liaison à différents agonistes et antagonistes spécifiques de la cholécystokinine et de la gastrine. Reconnue comme sécrétagogue majeur du pancréas exocrine et exhibant une trophicité pancréatique importante chez le rat adulte, la CCK présente une toute autre dynamique à la période fœtale et périnatale du développement pancréatique chez le rat : aplasie pancréatique chez le fœtus à terme, augmentation significative des concentrations enzymatiques et protéiques et faible augmentation du contenu en ADN chez le rat de 11 jours. Compte tenu de la présence de la gastrine au niveau du pancréas de rat au cours de cette même période, nous nous sommes interrogés à savoir si celle-ci ne pourrait pas stimuler la croissance de ce tissu puisque l'administration d'un analogue de la gastrine, la pentagastrine, au cours de la gestation chez le rat affectait considérablement la croissance du pancréas fœtal causant une hypertrophie de la glande.



Toutefois, un traitement au L-365,260, un antagoniste spécifique du récepteur CCK<sub>B</sub> retarde son développement causant ainsi l'aplasie du tissu pancréatique fœtal. La gastrine serait donc partiellement impliquée dans le contrôle de la croissance du pancréas fœtal via l'occupation du récepteur CCK<sub>B</sub> puisqu'après la naissance ainsi que chez le rat adulte, cette dernière n'a pas d'effet trophique sur le pancréas. À la lumière de ces observations, le premier aspect de ce travail a été d'évaluer, par buvardage Northern, Western ainsi que par immunohistochimie, la présence et la localisation des récepteurs CCK<sub>A</sub> et CCK<sub>B</sub> d'une part, au cours du développement pancréatique chez le rat, ainsi qu'au niveau du pancréas de souris, de porc et de fœtus humain.

Ce travail présente l'ontogénie de l'ARNm du récepteur CCK<sub>A</sub> chez le rat ; son patron d'expression démontre un certain parallélisme avec celui de la protéine récepteur. Ce dernier, retrouvé de façon prédominante au niveau de la membrane plasmique des cellules acineuses a de plus été identifié au niveau des cellules  $\beta$  (bêta) à insuline des îlots de Langerhans. Malgré une différence marquée dans leur poids moléculaire, les protéines du récepteur CCK<sub>A</sub> du pancréas de souris et de rat ont été localisées à la surface des mêmes cellules. On a de plus identifié ce récepteur CCK<sub>A</sub> par analyse Western dans le pancréas fœtal humain et de porc adulte bien qu'il n'aie été localisé uniquement au niveau des îlots de Langerhans.

Malgré le fait que l'expression du messenger du récepteur CCK<sub>B</sub> n'a pu être identifiée que par la technique de RT-PCR, l'analyse du patron d'expression de la protéine de ce dernier a permis d'identifier une protéine de 80 kDa qui n'indiquait aucune modulation au cours de l'ontogénie du pancréas de rat. À notre grand étonnement, la distribution de ce récepteur CCK<sub>B</sub> s'est avérée identique chez toutes les espèces étudiées soit, au niveau des cellules  $\delta$  (delta) à somatostatine des îlots de Langerhans. C'est à partir de ces résultats qu'il serait intéressant de vérifier l'hypothèse suivante à savoir que la gastrine jouerait un rôle majeur au cours du développement foetal du pancréas chez le rat, compte tenu que celle-ci est fortement exprimée au cours de cette même période. Tout comme le récepteur CCK<sub>B</sub>, la gastrine a été localisée au niveau des cellules  $\delta$  à somatostatine des îlots de Langerhans. Toutefois, l'expression de son messenger est restreinte à la période fœtale et périnatale telle que confirmée par immunofluorescence indirecte. Donc la gastrine pourrait être impliquée dans le contrôle de la différenciation et de la maturation pancréatique, probablement via l'occupation du récepteur CCK<sub>B</sub> au cours du développement pancréatique foetal. Pour la première fois, cette étude présente une évaluation extensive de la distribution et de la localisation des récepteurs à cholécystokinine dans le pancréas et supporte le fait que cette hormone, ainsi que la gastrine jouent divers rôles importants dans la physiologie pancréatique chez différentes espèces à différentes périodes de leur existence.

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

### **1.1 LE PANCRÉAS : PHYSIOLOGIE ET HISTOLOGIE**

Tout comme la thyroïde et la parathyroïde, le pancréas dérive de l'invagination de l'endoderme embryonnaire qui forme l'enveloppe épithéliale des voies gastro-intestinales et respiratoires. Il tient son origine de bulbes (ventral et dorsal) qui se manifestent de part et d'autre de l'intestin primitif (BURKITT et WEATHER, 1988) et qui au cours du développement normal, vont migrer par rotation l'un vers l'autre, s'accoler puis se fusionner.

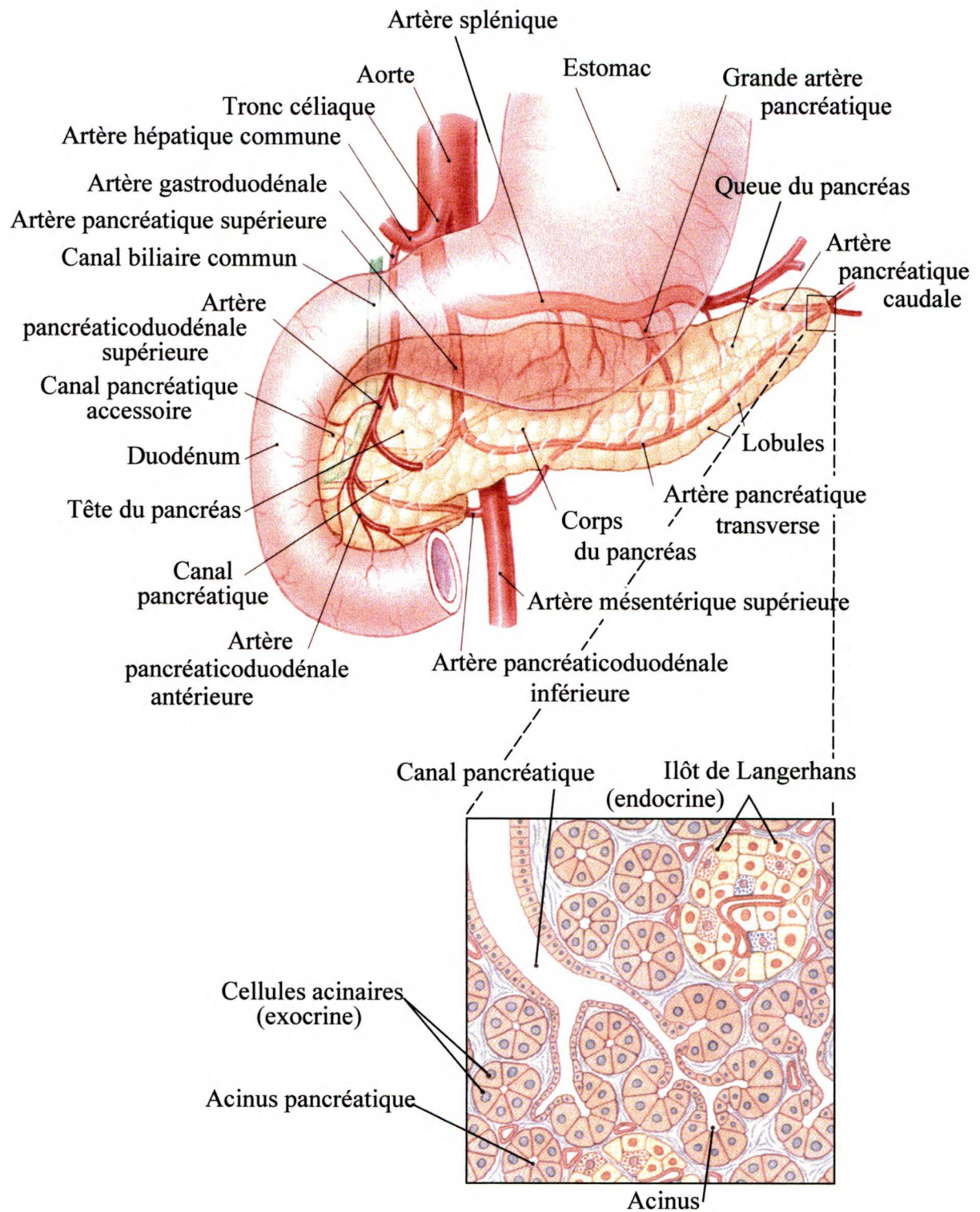
Cet organe est constitué de deux classes de tissus glandulaires. Les cellules exocrines sécrètent un liquide alcalin riche en enzymes digestives (aussi appelé suc pancréatique) qui s'écoule dans le canal pancréatique principal qui se jète dans le duodénum. Les cellules endocrines sécrètent des hormones circulantes qui, une fois libérées dans la circulation contrôlent le métabolisme du glucose ainsi que certaines des fonctions digestives.

Le tissu exocrine pancréatique est une glande lobulée à structure acinaire. Il est formé de cellules sécrétoires, de forme pyramidale, groupées en acini dont le pôle apical borde la lumière acinaire qui est en fine communication avec les ramifications du système de canaux (Figure 1); les acini représentent plus de 90% du volume de la glande (ELSÄSSER et al, 1986). On y retrouve aussi l'ensemble de l'épithélium canalaire qui comprend les cellules canalaire (ou ductales) et les cellules centroacinaires, riches en mitochondries; ces cellules sont impliquées dans une sécrétion d'eau et de bicarbonates et elles représentent environ 4% du volume de la glande (BOLENDER, 1974). Les cellules acinaires synthétisent et exportent la totalité des enzymes contenues dans la sécrétion, tandis que les cellules canalaire sécrètent une fraction importante de la sécrétion hydrobicarbonatée qui permet l'excrétion des enzymes et du mucus, la neutralisation de l'acide gastrique déversée dans le duodénum pour maintenir un pH favorable (au niveau de celui-ci) nécessaire à l'activité lytique optimale des enzymes pancréatiques assurant la digestion et l'absorption des nutriments. Tout comme la pepsine de l'estomac, les enzymes protéolytiques pancréatiques dont la trypsine, la chymotrypsine et la carboxypeptidase sont sécrétées sous forme inactive (zymogène). L'entérokinase, une enzyme sécrétée par la muqueuse duodénale, active le trypsinogène en trypsine ; la trypsine à son tour active le chymotrypsinogène et la procarboxypeptidase pour former la chymotrypsine et la carboxypeptidase. Cette présence d'enzymes inactives dans la glande empêche son autodigestion.

**Figure 1      Structure anatomique, localisation physique et anatomie macroscopique du pancréas humain : une glande mixte.**

Le pancréas est un organe mou, de forme triangulaire, situé derrière la grande courbure de l'estomac. Cette micrographie du tissu pancréatique diversement coloré montre l'îlot pancréatique (portion endocrine) entouré des cellules acineuses (portion exocrine), en orangé, qui élabore une substance exocrine (suc pancréatique riche en enzymes). Dans cette figure, les cellules  $\beta$  (bêta) des îlots, produisant l'insuline, apparaissent en jaune, les cellules  $\alpha$  (alpha) produisant le glucagon apparaissent en bleu alors que les cellules  $\delta$  (delta) qui produisent la somatostatine apparaissent en rouge.

Modifié de MARTINI et al., (2000)



Les autres enzymes, telles que l'amylase et la lipase pancréatique sont sécrétées sous forme actives mais requièrent la présence d'ions ou de bile dans la lumière intestinale pour acquérir une activité optimale. La portion endocrine du pancréas est principalement regroupée dans les îlots de Langerhans, qui se présentent comme des amas compacts sphéroïdaux disséminés à travers le tissu exocrine (Figure 1). Il existe quatre principaux types de cellules endocrines. Les cellules  $\beta$  (béta) sécrètent l'insuline et composent la majorité des cellules de l'îlot. Les cellules  $\alpha$  (alpha) sécrètent le glucagon, les cellules  $\delta$  (delta), la somatostatine et les cellules PP (ou F) sécrètent le polypeptide pancréatique (SLACK, 1995).

Les hormones des îlots perfusent les cellules acinaires environnantes via le système portal insulino-acinaire et régularisent partiellement la synthèse ainsi que le transport des enzymes digestives tout en jouant un rôle important dans la prolifération et la croissance de ces mêmes cellules : le glucagon, le PP et la somatostatine agissant comme inhibiteur de la sécrétion alors que l'insuline agit comme stimulateur via une action indirecte car il a été démontré qu'elle n'agit pas sur la sécrétion d'acini isolés (SHETZLINE et LIDDLE, 1998b).

Chez l'homme, les termes tête, corps et queue sont utilisés pour désigner les différentes régions du pancréas d'un point proximal à un point distal du duodénum, alors que chez le rongeur, la forme du pancréas est moins bien définie car l'organe est plus diffus. Chez ces derniers, la ségrégation des différentes cellules endocrines est très ponctuelle ; en effet, les cellules  $\beta$  sont concentrées au centre de l'îlot alors que les autres types de cellules demeurent en périphérie. Chez l'humain, cette ségrégation est moins précise quoiqu'existante et dépend de la région étudiée du pancréas (ORCI, 1982). La proportion de cellules endocrines n'est qu'une petite fraction de l'ensemble des cellules pancréatiques, soit environ 4% des cellules totales du pancréas chez le rat adulte (GITHENS, 1988).

## **1.2 MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA SÉCRÉTION PANCRÉATIQUE**

Le pancréas joue un rôle unique dans la physiologie digestive. Sa structure anatomique et sa localisation physique lui permettent de participer à plusieurs aspects de la digestion et de l'absorption des nutriments. Au début du siècle dernier, Pavlov a suggéré que le pancréas était exclusivement sous le contrôle de mécanismes nerveux PAVLOV. De plus, Bayliss et Starling (1902) ont publié leurs résultats sur la sécrétine et ont alors prétendu que la stimulation nerveuse du pancréas n'était que superflue et improbable.



Ce n'est qu'au cours des décennies qui suivirent, spécialement après la découverte de la cholécystokinine par IVY et OLDBERG (1928) qu'il a clairement été établi que la régulation de la sécrétion pancréatique était en fait sous le contrôle d'interactions 'neurohormonales' quoique majoritairement contrôlée par des hormones (ADLER, 1997). L'innervation intrinsèque du pancréas étant calquée sur celle de l'intestin, bien que moins abondante, joue un rôle très important dans la régulation de la sécrétion pancréatique, spécialement via le système parasympathique.

Les deux types cellulaires principaux du pancréas exocrine constituent la cible des mécanismes physiologiques de régulation de la sécrétion pancréatique grâce à des messages transportés par des facteurs chimiques de signalisation d'origine nerveuse, endocrine et paracrine. Au niveau des membranes basolatérales des cellules acinaires et ductales se trouvent des récepteurs hormonaux tels ceux de la CCK, de la sécrétine ainsi que des récepteurs à neurotransmetteurs dont ceux de l'acétylcholine (Ach), de la bombésine ou gastrin-releasing peptide (GRP) et du vasoactive intestinal peptide (VIP) qui une fois stimulés entraînent la sécrétion enzymatique et hydrobicarbonatée (GORELICK et al., 1994).

Ces messagers induisent la fusion des granules de zymogènes à la surface apicale des membranes plasmiques des cellules acinaires résultant ainsi en la relâche par exocytose des enzymes digestives dans la lumière du système canalaire pancréatique. Le processus de liaison d'un sécrétagogue à un récepteur membranaire conduisant ultimement à l'exocytose comprend la génération de messagers intracellulaires, la présence de médiateurs intracellulaires et finalement la relâche d'enzymes par exocytose impliquant de multiples organelles subcellulaires (ADLER, 1997).

### **1.3 MÉCANISMES NERVEUX**

La base biochimique du contrôle nerveux de la sécrétion pancréatique dépend des neurotransmetteurs impliqués. Il est dorénavant bien établi que plusieurs processus physiologiques utilisent des peptides comme neuropeptides. Ce système porte le nom de transmission peptidergique. Certains peptides, tels la CCK et la gastrine sont retrouvés dans le système gastro-intestinal ainsi que dans le système nerveux central (SNC) et périphérique ce qui rend difficile la séparation complète du contrôle hormonal et nerveux du pancréas voir impossible (LARSSON et REHFELD, 1979b; POWELL et al., 1985; UVNAS-WALLENSTEN et al., 1977).

Les neurones postganglionnaires intrapancréatiques qui régularisent les sécrétions enzymatiques et bicarbonatées du pancréas sont en majeure partie cholinergiques et sont activés par des influx élaborés au niveau du SNC et correspondent à la branche efférente des réflexes vagues.

Un certain nombre de corps cellulaires et surtout de fibres peptidergiques ont aussi été caractérisés par immunohistochimie : le VIP (HÖKFELT et al., 1982), le GRP (MAGHIMZADEH et al., 1983), la CCK<sub>4</sub> et la gastrine (BACA et al., 1983; LARSSON 1979a). Plusieurs autres hormones dont la bombésine, le PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) et le CGRP (calcitonine gene related peptide) auraient un effet neurophysiologique stimulateur alors que d'autres comme le NPY (neuropeptide Y) et les enképhalines causeraient un effet neurophysiologique inhibiteur sur la sécrétion pancréatique (BERNARD et al., 1998). La sécrétion pancréatique s'effectue de façon continue, même pendant les périodes interdigestives, alors que le système gastro-intestinal proximal est dépourvu de nutriments. Les mécanismes à la base de cette sécrétion continue sont encore mal compris; cependant puisque l'atropine, un antagoniste des voies cholinergiques muscariniques est en mesure de bloquer cette réponse basale chez toutes les espèces, ceci suggère un tonus cholinergique de base dont la participation est essentielle au niveau des cellules acineuses et ductales du pancréas.

En réponse à un repas, la participation de la voie cholinergique est claire bien que plusieurs autres mécanismes soient impliqués ; il existe des réflexes entéropancréatiques directs, la libération des facteurs hormonaux activateurs (sécrétine et CCK), une régulation cholinergique de la libération des facteurs hormonaux inhibiteurs (PP et somatostatine) ou encore une potentialisation par les neurones cholinergiques intrapancréatiques de l'effet des hormones circulantes, de d'autres neurotransmetteurs ou encore des facteurs paracrines (LÉVY, 1998).

Il n'y a pratiquement pas de preuve directe de l'existence de réflexe cholinergique vago-vagal responsable de la libération des facteurs hormonaux en dehors d'arguments de 'temps de latence' de la réponse à l'administration intraduodénale d'acides aminés et à l'injection de CCK intraportale qui sont augmentés suite à une vagotomie et à l'administration d'atropine (SINGER et al. 1980b). Les autres preuves sont indirectes et reposent sur la capacité de la vagotomie, de l'atropine et de la capsaïne (qui agit sur les neurones afférents) à réduire l'effet de substances administrées dans la lumière duodénale.

Des études ont clairement démontré que l'activation de la voie cholinergique représente une fraction substantielle de la sécrétion pancréatique sous des conditions physiologiques (KONTUREK et al., 1972). Des expériences effectuées chez l'homme ont permis de démontrer que l'effet stimulateur de la CCK à des doses physiologiques qui reproduisent les concentrations plasmatiques de CCK retrouvées suite à la prise d'un repas est presque totalement inhibé par l'atropine (BEGLINGER et al., 1992). Ces résultats suggèrent fortement que l'administration exogène de CCK à des concentrations physiologiques coopère avec le système cholinergique. De plus, comme l'effet stimulateur de la CCK endogène sur la sécrétion pancréatique n'est pas complètement inhibé par l'administration d'antagonistes des récepteurs à la CCK suggère qu'il existe un autre mécanisme majeur de régulation de la sécrétion pancréatique chez l'homme (BEGLINGER et al., 1992). Autrefois, l'activation postprandiale de la sécrétion pancréatique chez l'homme était entièrement attribuée à la stimulation vagale associée à la relâche d'Ach des terminaisons nerveuses efférentes ainsi qu'à la relâche dite cholinergique de gastrine (OWYANG ET WILLIAMS, 1991). Toutefois, la phase intestinale de la sécrétion pancréatique était majoritairement associée au contrôle endocrinien grâce à la CCK et à la sécrétine libérées des cellules I et S de la muqueuse duodénale lorsque mise en contact avec les produits de digestion et de l'acidité du chyme gastrique pénétrant l'intestin.

Ce type de contrôle ne semble pas unique car les nerfs vagues efférents du pancréas libèrent non seulement de l'Ach mais aussi d'autres neurotransmetteurs comme le GRP et le VIP (PANDOL, 1998). De plus, l'infusion de CCK à des doses physiologiques stimule la sécrétion pancréatique par l'entremise d'une voie sensible à l'atropine (ADLER et al. 1991; BOZKURT et al. 1988; SOUDAH et al. 1992) reliée à l'activation du nerf vague efférent; par contre, à des doses beaucoup plus élevées, la CCK agirait directement sur les cellules acinaires pour en stimuler la sécrétion (effet non inhibable par l'atropine) (OWYANG et al., 1996).

Ces évidences sur l'implication de voies neuronales plutôt qu'endocriniennes du pouvoir d'action de la CCK sur le pancréas découlent d'études réalisées chez certains animaux dont le chien où l'atropine inhibe la sécrétion pancréatique induite par la relâche endogène de CCK mais aussi par l'administration exogène de CCK (KONTUREK et al. 1972; SINGER et al. 1980a).

L'Ach et la CCK sont donc des joueurs clés dans le contrôle de la sécrétion pancréatique chez plusieurs espèces (GARDNER ET JENSEN, 1980; HOLST et al., 1979; LAROSE ET MORISSET, 1977; LOUIE et al., 1986) mais la place exacte qu'elles occupent dans le contrôle nerveux et endocrinien de celle-ci reste à être clarifiée.

## 1.4 MÉCANISMES HORMONAUX

La sécrétine et la cholécystokinine sont les principaux régulateurs hormonaux de la sécrétion pancréatique. Malgré ce fait, plusieurs autres facteurs ont été démontrés comme pouvant moduler la sécrétion exocrine du pancréas (Tableau 1). Cependant, l'endroit exact de leur intervention dans les mécanismes de régulation de la digestion fait toujours l'objet de mises au point et d'ajustements.

**Tableau 1 Régulation hormonale de la sécrétion pancréatique exocrine.**

Stimulation	Inhibition
Sécrétine	Somatostatine
Cholécystokinine	Glucagon
Gastrine	PP
Neurotensine	Peptide YY
Insuline	Neuropeptide Y
VIP	Enképhaline
GRP	CGRP
Bombésine	Pancréastatine
ATP (Adénosine 5'-triphosphate)	TRH (thyrotropin-releasing horm.)
UTP (Uridine triphosphate)	Glucagon-like peptide-1
Histamine	Dopamine

Modifié de SHETZLINE et LIDDLE, (1998)

### **1.4.1 LA CHOLÉCYSTOKININE**

L'ingestion de nutriments stimule la sécrétion d'hormones gastro-intestinales nécessaires à la coordination des processus de digestion et d'absorption de la nourriture. Le régulateur hormonal le plus important pouvant contrôler ces processus est la CCK. Elle a d'abord été identifiée puis caractérisée au niveau de la muqueuse duodénale (MUTT et JORPES, 1968) où elle tient des rôles importants dans le contrôle de la motilité gastro-intestinale (stimule la contraction de la vésicule biliaire / augmente la contraction des muscles lisses du pylore / stimule la motilité de l'intestin grêle et du colon / inhibe la vidange gastrique / relaxe le sphincter d'Oddi) ainsi que dans le contrôle de diverses sécrétions gastro-intestinales (stimule la sécrétion et la croissance pancréatiques / stimule faiblement la sécrétion d'acide gastrique / stimule la sécrétion d'insuline et du polypeptide pancréatique) (WALSH, 1994). Elle est de plus largement distribuée au niveau du SNC et périphérique où elle agit en tant que neurotransmetteur (MUTT, 1994) et est étroitement liée au phénomène de la satiété (REIDELBERGER, 1994).

Plusieurs formes moléculaires de la CCK, de composition variant de 4 à 58 acides aminés, ont été retrouvées en circulation périphérique ainsi qu'au niveau du SNC (MORISSET, 1989).



Aussi retrouvée au niveau du nerf vague, la forme non-sulfatée de la CCK<sub>8</sub> est cependant le fragment le plus abondant retrouvé au niveau du cerveau tandis que le tétrapeptide CCK<sub>4</sub> demeure la plus petite forme biologiquement active encore identifiée (CRAWLEY et CORWIN, 1994). Toutefois, la présence d'une tyrosine, située à 7 résidus de l'extrémité C-terminale est toujours sulfatée sur la CCK : cette différence de structure avec la gastrine détermine l'affinité relative pour les récepteurs de différents types.

Comme la plupart des hormones gastro-intestinales, la CCK est relâchée dans la circulation en réponse à l'ingestion d'un repas. Une diète riche en graisses (SUN et al. 1992), en protéines (BRANNON, 1990), la diversion du suc pancréatique (RIVARD et al., 1991) ainsi que l'administration d'inhibiteurs de protéases (MIYASAKA et al. 1989b) sont tous d'excellents moyens pour augmenter la relâche endogène de CCK et par le fait même, de stimuler la sécrétion des enzymes (PIERZYNOWSKI et al., 1993) et la croissance pancréatique (RIVARD et al. 1991).

La relâche de CCK des cellules endocrines I de la muqueuse duodénale est contrôlée par deux différents peptides; 1) le peptide moniteur, sécrété par les cellules acinaires (IWAI et al. 1986) et 2) le CCK releasing peptide libéré par les entérocytes de la muqueuse intestinale (LU et al. 1989; MIYASAKA et al. 1989a).

Ces peptides sont inactifs au cours des périodes interdigestives puisque digérés par la trypsine libre issue d'une sécrétion pancréatique basale. Toutefois, après l'ingestion d'un repas, la trypsine occupée à digérer les nutriments présents dans la lumière du tube digestif permet au peptide moniteur et au CCK releasing peptide de stimuler la relâche de CCK endogène et ainsi de favoriser la sécrétion de suc pancréatique (BERNARD et al., 1998).

#### **1.4.2 LA GASTRINE**

Peptide de la même famille que la CCK, la gastrine est synthétisée par les cellules endocrines G de la muqueuse de l'antré pylorique. Une fois convertie, cette préprohormone est retrouvée dans la circulation sanguine sous formes de gastrine<sub>34</sub> et de gastrine<sub>17</sub>. Parmi les modifications post-traductionnelles importantes reliées à son activité, notons tout d'abord l'ajout d'une glycine en position C-terminale de la gastrine<sub>34</sub> qui ensuite, peut être convertie en résidu amine puis, une sulfatation du 6<sup>ième</sup> résidu (tyrosine) non-essentielle à l'activité biologique de l'hormone (REHFELD ET VAN SOLINGE, 1994; DOCKRAY et al., 1996). Cependant, la gastrine<sub>17</sub>gly est un produit fini distinct et n'est pas convertie en gastrine<sub>17</sub> amidée (VARRO et al., 1995).

La gastrine<sub>17</sub> amidée est la forme de gastrine la plus abondante dans l'antrum gastrique contrairement au duodénum, importante source de gastrine chez l'homme, qui contient autant de gastrine<sub>34</sub> que de gastrine<sub>17</sub> (WALSH, 1994). De plus, des quantités considérables de gastrine sont retrouvées au niveau des cellules  $\delta$  (delta) du pancréas humain et de rat au cours de la période fœtale et périnatale de leur développement quoiqu'absente du tissu pancréatique de rat adulte (BRAND et FULLER, 1988; MAJUMDAR, 1984; MORISSET et al., 2000). Son expression au niveau du pancréas de rat (présente dès le 16<sup>ième</sup> jour de vie fœtale) précède dans le temps celle dans l'antrum pylorique (apparaît ~5 jours après la naissance) (WANG et al., 1997). Cette hormone possède, tout comme la CCK, un très large spectre d'actions biologiques (Tableau 2). Malheureusement, la plupart de ces effets ne sont atteints qu'à des doses supramaximales ou pharmacologiques de gastrine. Elle est non seulement un puissant stimulateur 'physiologique' ( $K_d \cong 10^{-8}M$  avec une réponse maximale  $\cong 10^{-7}M$ ) de la sécrétion de pepsinogène (CHERNER et al., 1988; RAUFMAN, 1992) et d'acide chloridrique (SANDVIK ET WALDUM, 1991; SOLL, 1980), mais aussi un facteur de croissance majeur de la muqueuse gastrique (NAGATA et al., 1996) et d'une multitude de tissus cancéreux tels que les cancers pancréatiques (SMITH et al., 1995), les néoplasies intestinales (TOWNSEND et al., 1988), les cancers colorectaux et gastriques (WALSH, 1994; WATSON et al., 1989a) ainsi que les cancers du colon (WATSON et al., 1989b).

**Tableau 2      Actions biologiques de la gastrine.**

---

**Sécrétion d'eau et d'électrolytes**

Estomac

Pancréas

Intestin grêle

Glande de Brunner

**Sécrétion enzymatique**

Estomac

Pancréas

Intestin grêle

**Inhibition de la sécrétion d'eau et d'électrolytes**

Intestin grêle

**Stimulation de la contraction des muscles lisses**

Sphincter œsophagien inférieur

Estomac

Intestin grêle

Colon

Vésicule biliaire

**Inhibition de la contraction des muscles lisses**

Antre pylorique

Sphincter iléo-caecale

Sphincter d'Oddi

**Relâche hormonale**

Insuline

Calcitonine

**Augmentation de l'afflux sanguin**

Estomac

Pancréas

Intestin grêle

**Effet trophique**

Muqueuse gastrique

Muqueuse de l'intestin grêle

Pancréas

---

Modifié de WALSH et al., (1994)

Jadis, deux hypothèses concernant le mode d'action de ce peptide sur la sécrétion acide ont été proposées ; l'une veut que la gastrine agisse directement sur les cellules pariétales (Soll et al., 1984), l'autre favorise plutôt la relâche d'histamine des cellules entérochromaffin-like (ECL), capable d'agir à son tour sur les cellules pariétales via son récepteur  $H_2$  (SANDVIK et al., 1987; LLOYD et al., 1992). Aujourd'hui, plusieurs évidences supportent ces deux théories et démontrent la pertinence de l'effet physiologique de la gastrine sur la sécrétion acide (CHUANG et al., 1991; OIRY et al., 1995; PRINZ et al., 1994).

#### **1.4.3 LES RÉCEPTEURS À CHOLÉCYSTOKININE ET À GASTRINE**

Deux grandes classes de récepteurs de la cholécystokinine et de la gastrine ont pharmacologiquement été caractérisées sur la base de leur affinité et de leur profil respectif de liaison à différents agonistes et antagonistes spécifiques (TULLIO et al., 1999). La première classe de récepteurs a d'abord été caractérisé au niveau du pancréas (SANKARAN et al., 1980) avec la découverte subséquente d'une seconde classe au niveau du cerveau (INNIS et SNYDER, 1980). Plus tard, un troisième type, nommé récepteur à gastrine, particulier aux cellules pariétales et responsable de la sécrétion d'acide (SONG et al., 1993), a subséquemment été démontré comme étant le récepteur  $CCK_B$  (KOPIN et al., 1992; SONG et al., 1993).

La CCK et la gastrine partagent la même séquence C-terminale pentapeptidique mais la sulfatation du 6<sup>ième</sup> résidu tyrosine de la gastrine n'est pas nécessaire à l'activité optimale de celle-ci contrairement à celle du 7<sup>ième</sup> résidu tyrosine de la CCK. Le récepteur CCK<sub>A</sub> lie la CCK<sub>8</sub> sulfatée avec une affinité maximale de 20 pM mais possède 1000 fois moins d'affinité pour la forme non-sulfatée de la CCK<sub>8</sub> et de la gastrine<sub>17</sub>. Situé à la surface basolatérale de l'acinus pancréatique, le récepteur CCK<sub>A</sub> existe sous trois différents états ; un premier dit de haute affinité (constante de dissociation [Kd] : 1 nM) , un second de faible affinité [Kd] : 30 nM, puis un dernier possédant très peu d'affinité pour la CCK<sub>8</sub> [Kd] : 13  $\mu$ M (TALKAD et al., 1994; YU et al., 1990). Quant à lui, le récepteur CCK<sub>B</sub> lie la CCK<sub>8</sub> et la gastrine<sub>17</sub> avec la même affinité (nM) et la liaison de son ligand ne requiert pas de sulfatation.

Fait intéressant, chacune de ces trois différentes 'formes' de CCK<sub>A</sub> a la même affinité (3nM) pour l'antagoniste L-364, 718 (TALKAD et al., 1994). Ces différences d'affinité sont une propriété intrinsèque des récepteurs CCK<sub>A</sub> et CCK<sub>B</sub>.

Les premiers antagonistes développés contre les récepteurs à CCK n'étaient pas très sélectifs et puissants. Parmi ceux-ci, les dérivés du proglumide et du benzotrip (HAHNE et al., 1981) possédaient une affinité de l'ordre du mM pour déplacer la liaison de la CCK au niveau des récepteurs pancréatiques et de la glande gastrique. Dès lors, une équipe de Merck, Sharp et Dohme a réalisé une percée majeure dans le domaine des récepteurs à CCK lors de l'isolement de l'antagoniste asperlicine du champignon *Aspergillus alliaceus* (CHANG et al., 1985). Une modification du noyau benzodiazépine de l'asperlicine a permis de mettre au point des antagonistes très puissants et sélectifs du récepteur CCK<sub>A</sub> tel que le L-364 718 (CHANG et al., 1986) et du récepteur CCK<sub>B</sub>, le L-365, 260 (LOTTI et CHANG, 1989). Depuis, plusieurs antagonistes (TULLIO et al., 1999) possédant une affinité de l'ordre du nM et très sélectifs pour l'un ou l'autre des récepteurs à CCK ont été mis au point (Tableau 3).

#### **1.4.3.1 CARACTÉRISATION DES RÉCEPTEUR À CCK**

Les récepteurs CCK<sub>A</sub> et CCK<sub>B</sub> ont d'abord été identifiés comme des glycoprotéines membranaires tel que démontré par liaisons covalentes de peptides iodés et par traitements enzymatiques aux glycosidases des complexes en résultant (BALDWIN, 1993).

**Tableau 3      Affinités et profils de liaison des récepteurs CCKA et CCKB pour différents agonistes & antagonistes.**

Ces valeurs de constantes de dissociation [Kd] ont été déterminées par compétitions de liaison de la [<sup>125</sup>I]CCK<sub>8</sub> et de la [<sup>125</sup>I]CCK<sub>33</sub> en présence de membranes de pancréas (CCK<sub>A</sub>), de cortex cérébral (CCK<sub>B</sub>) ou avec des cellules COS ou CHO entières transfectées avec l'ADNc encodant pour le récepteur CCK<sub>A</sub> de vésicule biliaire humaine (ULRICH et al., 1993) ou pour le récepteur CCK<sub>B</sub> de cerveau humain (PISEGNA et al., 1992; LEE et al., 1993). Ces valeurs sont issues d'études réalisées sur les récepteurs à CCK humains à moins d'indications particulières ; \* cochon d'Inde, † souris, ‡ rat.



**Tableau 3 Affinités et profiles de liaison des récepteurs CCK<sub>A</sub> & CCK<sub>B</sub> pour différents agonistes & antagonistes.**

	[Kd] (nM)		Ratio
	CCK <sub>A</sub>	CCK <sub>B</sub>	CCK <sub>A</sub> /CCK <sub>B</sub>
<b>Agonistes</b>			
Gastrine <sub>17</sub>	80	6.4	13
CCK <sub>8</sub>	140*	1.9	74
CCK <sub>8</sub> SO <sub>4</sub>	0.02	3.0	0.0067
A57696	14000*	27*	520
A71378	0.42*	1200*	0.0035
JMV 180	16*	53*	0.3
<b>Antagonistes non-sélectifs</b>			
Proglumide	600000†	875000*	0.69
Benzotrip	102000†	84000*	1.2
<b>Antagonistes sélectifs (CCK<sub>A</sub>)</b>			
CR 1409	22*	2200*	0.01
L-364 718	0.1	500	0.0002
PD 140 548	2.8†	260†	0.011
SR 27897	0.6†	490*	0.0012
<b>Antagonistes sélectifs (CCK<sub>B</sub>)</b>			
PD 134 308	2700‡	1.7‡	160
RB 211	1060*	6.1*	170
L-365 260	9000	10	900
RP 73870	1600*	0.48*	3400
JMV 320	>10000*	2.6*	>3800
Tetronothiodin	>100000‡	3.6‡	<27000

Modifié de SHULKES et BALDWIN, (1997)

L'analyse SDS-PAGE du récepteur à CCK au niveau du pancréas de rat a permis d'identifier une bande diffuse de 85-95 kDa (PEARSON et MILLER, 1987) ainsi qu'une bande de 42 kDa correspondant au cœur du récepteur (protéine n'ayant subi aucune modification post-traductionnelle). Le récepteur à gastrine isolé de cellules pariétales de chien partiellement purifiées migre lui aussi sous la forme d'une bande diffuse avec un poids moléculaire d'environ 74 kDa (MATSUMOTO et al., 1987). Nous savons désormais que les récepteurs CCK<sub>A</sub> et CCK<sub>B</sub> font tous deux partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7DTMs) couplés à des protéines G trimériques. Une étude comparative de toutes les séquences connues des récepteurs à CCK a permis de révéler qu'il existait une très forte homologie entre tous ces membres et que celle-ci était particulièrement confinée au niveau des hélices transmembranaires ainsi qu'au niveau de la première et de la seconde loupe intracellulaire.

Les premiers rapports faisant allusion à la séquence nucléotidique encodant pour des récepteurs à CCK datent de 1992 (KOPIN et al., 1992; WANK et al., 1992a). L'ADNc encodant pour le récepteur CCK<sub>A</sub> et le récepteur CCK<sub>B</sub> ont respectivement été clonés par PCR à l'aide d'oligonucléotides fondés sur la séquence peptidique obtenue des récepteurs purifiés, par criblage de banques d'ADN (WANK et al., 1992a) ainsi que par l'expression de clones dans les cellules COS (KOPIN et al., 1992).

Depuis, la séquence du récepteur CCK<sub>A</sub> humain (DE WEEATH et al., 1993a; URLICH et al., 1993), de cochon d'Inde (DE WEEATH et al., 1993b), de lapin (REUBEN et al., 1994) de rat (WANK et al., 1992a) et de souris (LACOURSE et al., 1997) ainsi que la séquence du récepteur CCK<sub>B</sub> humain (PISEGNA et al., 1992), de cochon d'Inde (Wank et al., 1994), de veau (DUFRESNE et al., 1996), de chien (KOPIN et al., 1992), de *Mastomys natalensis* (NAKATA et al., 1992), de lapin (BLANDIZZI et al., 1994) et de rat (WANK et al., 1992a) ont été déterminées.

L'activation des récepteurs CCK<sub>A</sub> et CCK<sub>B</sub> menant respectivement au contrôle de la sécrétion d'enzymes pancréatiques et d'acide chloridique s'effectue par l'entremise des mêmes voies de signalisation (WILLIAMS et BLEVINS, 1993; CHEW et al., 1992).

La CCK stimule la relâche d'amylase des acini pancréatiques de façon biphasique : stimulation de 1-100 pM, inhibition de 100 pM -10 nM (WILLIAMS et BLEVINS, 1993). D'aussi faibles concentrations de CCK<sub>8</sub> entraînent des oscillations calciques tandis que de plus fortes concentrations causent d'importantes augmentations de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire qui sont toutefois transitoires.

Des expériences réalisées à l'aide d'un analogue de la CCK<sub>8</sub>, le JMV 180 qui s'associe avec le récepteur CCK<sub>A</sub> de haute et de faible affinité (HUANG et al., 1994), suggèrent que ces différentes formes d'affinité pourraient être reliées à différentes voies de signalisation. En fait, l'occupation des récepteurs CCK<sub>A</sub> à haute affinité induit elle aussi des oscillations calciques et la sécrétion d'amylase par l'intermédiaire d'un mécanisme indépendant de la production d'IP<sub>3</sub> alors que l'occupation des sites de faible affinité conduit à l'hydrolyse du phosphatidylinositol par la PLC résultant alors en l'augmentation des niveaux d'IP<sub>3</sub>, subséquemment du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire puis finalement, en l'inhibition de la sécrétion d'amylase.

Donc, le JMV 180 agit comme agoniste des sites à haute affinité, comme antagoniste de sites à faible affinité, stimule la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire sans toutefois causer d'augmentation marquée de celui-ci et n'affecte pas la production d'IP<sub>3</sub> (WILLIAMS et BLEVINS, 1993).

#### **1.4.3.2 MÉCANISMES DE TRANSDUCTION**

La stimulation des cellules acinaires pancréatiques par la CCK entraîne l'hydrolyse du phosphatidylinositol diphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) conduisant ultimement à la formation d'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) et de diacylglycérol (DAG) (WILLIAMS et BLEVINS, 1993). Des augmentations similaires du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (CHEW et al., 1992) et d'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) (CHEW et BROWN, 1986; CHIBA et al., 1988) en réponse à la gastrine ont été démontrées à partir de cellules pariétales isolées de différentes espèces.

Ces effets sont contrecarrés par la pertussis toxine mais demeurent insensibles à la choléra toxine, ce qui suggère qu'ils sont transmis par l'interaction du récepteur à gastrine avec une protéine  $G_i$  (ROCHE et al., 1990). Cependant, le type de protéine G chargé de transmettre l'effet de la CCK sur la sécrétion pancréatique des acini pancréatiques demeure, aujourd'hui encore l'objet de controverses (WILLIAMS et BLEVINS, 1993). Des études ont clairement permis d'identifier la présence des protéines  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{11}$  et  $G\alpha_{14}$  au niveau des cellules acinaires pancréatiques de rat et de souris mais ni l'injection d'anticorps spécifiques aux protéines  $G\alpha_q / 11$  (YULE et al. 1999) ni l'utilisation de souris déficiente en  $G\alpha_{14}$  (XU et al. 1998) ont permis d'établir une quelconque spécificité entre les sous-unités  $\alpha$  des protéines G et le récepteur  $\text{CCK}_A$  (XU et al. 1998).

Dans les cellules de mammifères, au moins trois grandes cascades d'événements, sous le contrôle des petites protéines G Ras sont responsables du contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de la réponse aux stress. Au centre même de ces voies de transduction sont retrouvées, les MAPKs, les ERKs, les JNKs et la p38 MAPK.

Des travaux récents ont permis de démontrer qu'il était possible, en réponse à la CCK dans les cellules acinaires pancréatiques, d'activer ces différentes formes de MAPKs (SCHÄFER et al., 1998; WAGNER et al., 1999; WILLIAMS, 1997). En fait, l'activation des récepteurs CCK<sub>A</sub> et CCK<sub>B</sub> a été démontrée comme pouvant moduler la progression du cycle cellulaire d'abord par une mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire menant ultimement à la mitose : effets inhibés par l'utilisation d'antagonistes appropriés (SETHI et ROZENGURT, 1992; SETHI et al., 1993; TANIGUCHI et al., 1994). Les mécanismes impliqués dans cette réponse ont été étudiés à l'aide de fibroblastes transfectés avec le récepteur CCK<sub>B</sub> où la relâche d'IP<sub>3</sub> entraîne une augmentation des concentrations de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire ainsi que la prolifération cellulaire (TANIGUCHI et al., 1994; SEUFFERLEIN et al., 1995). De plus, la protéine Raf-1 et les MAPKs sont activées en réponse à la gastrine via des mécanismes indépendants de l'activation des protéines G<sub>i</sub> et de la protéine kinase C (PKC) (SEUFFERLEIN et al., 1995).

Toutefois, certaines évidences ont permis de démontrer que la PKC et le  $\text{Ca}^{2+}$  pourraient être impliqués dans l'activation des MAPKs par la gastrine dans les cellules AR4-2J (carcinome pancréatique) (DAULHAC et al., 1997). De plus, en réponse à la gastrine, la 'focal adhesion kinase' (Fak) et la paxilline sont phosphorylées sur résidus tyrosine alors que l'expression de gènes précoces tels *c-fos* et de *c-myc* est augmentée (TANIGUCHI et al., 1994).

Contrairement à la gastrine, la CCK active les ERKs via un mécanisme principalement dépendant de PKC sans toutefois augmenter l'association de GTP à la protéine membranaire Ras dans les acini pancréatiques (DABROWSKI et al., 1997). De plus, l'activation de Raf est essentielle à celle des ERKs médiée par la CCK (NICKE et al., 1999). Toutefois, l'activation de Ras n'est pas nécessaire pour stimuler la sécrétion d'amylase, du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et des ERKs mais l'est pour l'activation des JNKs et pour la synthèse d'ADN amenées par la CCK tel que démontré par transfection rétro-virale d'un dominant-négatif de Ras dans des acini pancréatiques isolés (NICKE et al., 1999). Ces résultats suggèrent que l'activation de la synthèse d'ADN donc, de la progression du cycle cellulaire, par la CCK s'effectue par l'intermédiaire d'une voie différente de celle menant à l'activation des ERKs quoique dépendante de Ras.

### 1.4.3.3 HÉTÉROGÉNÉITÉ INTER-ESPÈCES

Les propriétés de liaison des récepteurs à CCK provenant de différentes espèces et exprimés dans les cellules COS diffèrent très peu. Par exemple, l'affinité relative inter-espèces de la CCK<sub>8</sub> ( $K_d = 0.1-1 \times 10^{-9} \text{M}$ ) pour le récepteur CCK<sub>B</sub> est près de trois fois plus élevée que pour la gastrine<sub>17</sub> ( $K_d = 0.3-3 \times 10^{-9} \text{M}$ ). Il en est de même pour l'antagoniste L-364, 718 (sélectif du CCK<sub>A</sub>,  $K_d = 1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) qui possède 100 fois moins d'affinité que le L-365, 260 (sélectif du CCK<sub>B</sub>,  $K_d = 1 \times 10^{-8} \text{M}$ ) (DENYER et al., 1994; DE WEERTH et al., 1993; PISEGNA et al., 1992; WANK et al., 1992b; WANK et al., 1994). Toutefois, les récepteurs CCK<sub>B</sub> du chien et du *Mastomys natalensis* répondent différemment à ces agonistes et antagonistes; chez *Mastomys*, le CCK<sub>B</sub> présente autant d'affinité pour la CCK<sub>8</sub> que pour la gastrine<sub>17</sub> alors que le CCK<sub>B</sub> de chien interagit plus efficacement avec le L-364, 718 (sélectif du CCK<sub>A</sub>,  $K_d = 1.9 \times 10^{-8} \text{M}$ ) qu'avec le L-365, 260 (sélectif du CCK<sub>B</sub>,  $K_d = 1.3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) (KOPIN et al., 1992; NAKATA et al., 1992). Ces résultats, obtenus à partir de récepteurs recombinants sont très semblables à ceux obtenus à partir des récepteurs natifs humains, de cochon d'Inde et de rat (JENSEN et al., 1990; LIGNON et al., 1991; QIAN et al., 1993) mais différent de ceux obtenus à partir du récepteur à gastrine natif du chien (SOLL et al., 1984) et soulèvent la question suivante : existe-t-il une spécificité cellulaire nécessaire à la maturation de ces récepteurs, et est-ce que celle-ci influence leur l'affinité ?



De plus, la pertinence de ces effets obtenus *in vitro* à partir de récepteurs recombinants reste à discuter et il demeure important de confirmer l'efficacité de ceux *in vivo*. Malgré tout, plusieurs ambiguïtés règnent encore aujourd'hui au sujet de l'hétérogénéité d'expression des différents types de récepteurs à CCK au niveau du pancréas selon les espèces. Pour l'instant, le pancréas de souris et de rat expriment exclusivement le récepteur à cholécystokinine (HADJIIVANOVA et al., 1992; POVOSKI et al., 1994) tandis que les deux types de récepteurs sont présents dans le pancréas humain (NISHIMORI et al., 1999), de porc (PHILIPPE et al., 1997), de veau (LE MEUTH et al., 1993), de chien et du cochon d'Inde (FOURMY et al., 1987). Toutefois, l'expression du récepteur à gastrine prédomine celle du récepteur à cholécystokinine chez l'homme (NISHIMORI et al., 1999), le veau (LE MEUTH et al., 1993) et chez le porc (MORISSET et al., 1996; PHILIPPE et al., 1997) suggérant un rôle pour la gastrine dans la régulation des fonctions sécrétrices pancréatiques chez ces espèces (DUFRESNE et al., 1996; TANG et al., 1996). À l'inverse de celles-ci, le chien est le seul grand mammifère où l'expression du récepteur CCK<sub>A</sub> est majoritaire par rapport au récepteur de type B (FOURMY et al., 1987). De son côté, la sécrétion pancréatique humaine semble d'avantage sous l'emprise du récepteur CCK<sub>A</sub> localisé sur des neurones cholinergiques activés en réponse à la libération de CCK endogène (des cellules endocrines de la muqueuse duodénale et de fibres peptidergiques) et exogène (ADLER et al., 1991).

Il en est de même chez le veau où malgré sa minorité, le récepteur CCK<sub>A</sub> joue un rôle majeur dans le contrôle de la sécrétion pancréatique (LE DRÉAN et al., 1999). Contrairement au rat, la CCK est un très faible stimulant de la sécrétion pancréatique chez le porc si l'on se base sur le fait que la concentration plasmatique 'seuil' de CCK (>100 pM) nécessaire pour stimuler sa sécrétion pancréatique est de 6 à 7 fois plus grande que celle atteinte lors de la prise d'un repas (~15 pM) (CUBER et al., 1989). De plus, l'administration du MK 329, un antagoniste sélectif du récepteur CCK<sub>A</sub>, n'affecte que très faiblement la sécrétion pancréatique causée par la prise d'un repas ou par l'infusion de cholécystokinine et de sécrétine simultanément (LHOSTE et al., 1995) mais elle demeure néanmoins très sensible à une stimulation cholinergique muscarinique (HICKSON, 1981).

#### **1.4.4 NOUVEAUX RÉCEPTEURS À CCK**

Une découverte excitante a été la description de récepteurs pouvant lier des peptides dérivés de la progastrine. Autrefois, seules les formes amidées de la gastrine étaient reconnues comme étant biologiquement actives; maintenant, il est dorénavant bien établi que la gastrine<sub>17</sub>gly est capable de stimuler le croissane des cellules AR4-2J (carcinome pancréatique) (SEVA et al., 1994) et des cellules Swiss 3T3 (fibroblastes) (SINGH et al., 1994).

Cette forme de gastrine est retrouvée dans la circulation à des concentrations similaires à celles de la gastrine amidée (DELVALLE et al., 1987). Cependant, des concentrations très élevées de gastrine<sub>17gly</sub> ont été identifiées au sein de tumeurs malignes tels certains adénocarcinomes (FINLEY et al., 1993; SINGH et al., 1994; VAN SOLINGE et al., 1993).

Quoique la gastrine<sub>17gly</sub> ait 10 000 fois moins de potentiel que la forme amidée pour stimuler la sécrétion d'acide gastrique (MATSUMOTO et al., 1987), elle demeure néanmoins aussi efficace que celle-ci pour promouvoir la croissance des cellules AR4-2J tel que démontré par incorporation de [<sup>3</sup>H] thymidine ainsi que par mesure de l'activité ornithine décarboxylase. De plus, un faible nombre de sites spécifiques à haute affinité pour la gastrine<sub>17gly</sub> ont été identifiés par liaison de la [<sup>125</sup>I] Leu-15-gastrine-(2-17) humaine : constante de dissociation [ K<sub>d</sub> ] = 0.45 nM, capacité de liaison maximale (B<sub>max</sub>) = 4.0 fmol / 10<sup>6</sup> cellules.

Ces effets sur la croissance des cellules AR4-2J ne sont pas médiés par l'association de la gastrine<sub>17gly</sub> au récepteur CCK<sub>B</sub> mais bien par son association à un autre type de récepteur tel que démontré par l'utilisation d'antagonistes spécifiques du récepteur CCK<sub>B</sub>, le L-365,260 et le PD-134308 (SEVA et al., 1994).

D'autre part, une protéine de 78 kDa surnommée CCK<sub>C</sub> a été identifiée dans les cellules HCT116 (carcinome colique) (HOOSEIN et al., 1988) ainsi qu'au niveau de la muqueuse gastrique de porc (BALDWIN, 1994). Ce nouveau récepteur présente peu d'affinité pour la CCK et la gastrine (Kd de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) (BALDWIN, 1994). Cloné de la muqueuse gastrique de porc, il encode pour une protéine de 763 acides aminés et a été proposé pour faire partie d'une sous-famille du récepteur CCK<sub>B</sub> (BALDWIN, 1993). De plus, les travaux de SMITH et al., (1999) rapportent la présence d'un récepteur aussi appelé CCK<sub>C</sub> (c : cancer) de 40 kDa retrouvé spécifiquement dans tous les cancers pancréatiques humains quoique absent du tissu pancréatique normal. Toutefois, aucune donnée fonctionnelle supporte cette affirmation.

Finalement, des études de liaisons de la gastrine et de ses effets biologiques dans les cellules LoVo (carcinome colique humain) ont permis de mettre en évidence un autre type de récepteur à CCK. La gastrine arrive à stimuler la croissance de celles-ci de façon biphasique ( $10^{-12}$  et  $10^{-8}$  M) ; croissance non contrecarrée par l'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs CCK<sub>A</sub>, le L-364, 718 et CCK<sub>B</sub>, le L-365, 260 quoique inhibée par le JMV-320, antagoniste du récepteur CCK<sub>B</sub> (BOLD et al., 1994; ISHIZUKA et al., 1994). Cette croissance (maximale à  $10^{-12}$  et  $10^{-8}$  M de gastrine) est probablement médiée par l'AMPc puisque ce second messenger augmente en réponse à la gastrine de façon dose dépendante.

#### **1.4.5 MUTANTS NATURELS & ANIMAUX TRANSGÉNIQUES**

Le récepteur CCK<sub>A</sub> (KENNEDY et al., 1995; SILVENTE-POIROT et al., 1994) ainsi que le récepteur CCK<sub>B</sub> (MIYAKE et al., 1995) existent sous formes tronquées : le premier domaine transmembranaire de ces récepteurs est absent ayant pour effet de diminuer de près de 10 fois l'affinité des agonistes et des antagonistes respectifs de ces deux récepteurs. De plus, une forme mutée du récepteur CCK<sub>B</sub> humain a été identifiée à partir d'échantillons de muqueuse gastrique humaine où 5 acides aminés de la troisième loupe intracellulaire du récepteur sont absents (SONG et al., 1993). Jusqu'ici, aucune évidence n'a permis d'identifier des variations dans la capacité de liaison et dans la cascade d'événements intracellulaires engendrées par ce récepteur CCK<sub>B</sub> muté par rapport au récepteur de type sauvage.

Des études physiologiques et moléculaires réalisées chez la lignée de rats Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF), ont permis d'établir une absence congénitale 'naturelle' d'expression du gène du récepteur CCK<sub>A</sub> chez ces derniers. D'abord établie en 1992 comme outil d'étude du diabète mellitus non-insulino-dépendant, cette lignée sert aujourd'hui de modèle expérimental pour l'étude et la compréhension des fonctions biologiques associées au récepteur CCK<sub>A</sub> du rat normal.

Parmi ces fonctions, notons tout d'abord son rôle important dans le contrôle de la satiété résultant en une hyperphagie chez les rats OLETF (MIYASAKA et al., 1994). De plus, le récepteur CCK<sub>A</sub> joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de la glande gastrique (OLETF : susceptibilité à l'ulcération gastrique) (OKUMURA et al., 1996), dans la sécrétion d'acide gastrique (SHOJI et al., 1996), ainsi que dans la vidange gastrique (OLETF : vidange gastrique retardée) (SHOJI et al., 1997). Finalement, le récepteur CCK<sub>A</sub> est aussi impliqué dans l'atrophie pancréatique associée à une croissance normale (MIYASAKA et al., 1996) ainsi que dans la sécrétion pancréatique exocrine stimulée en réponse à la CCK (OLETF : fonctions pancréatiques exocrines non-affectées par la CCK quoique stimulées en réponse à l'acétylcholine et à la sécrétine) (FUNAKOSHI et al., 1996b).

Ces études ont aussi permis de déterminer l'implication du récepteur CCK<sub>A</sub> dans la régénération pancréatique (MIYASAKA et al., 1997b), la synthèse et la sécrétion de la CCK (MIYASAKA et al., 1997a), le maintien d'une glycémie normale (TAKIGUCHI et al., 1998) ainsi qu'au cours de processus contrôlant l'apprentissage et la mémoire (NOMOTO et al., 1999).

#### **1.4.6 SOURIS TRANSGÉNIQUE : EXPRESSION DU CCK<sub>B</sub> HUMAIN**

Nos connaissances des fonctions attribuées aux récepteurs à CCK découlent de vastes études réalisées entre autres chez le rat et la souris qui n'expriment que le CCK<sub>A</sub> (WILLIAMS ET BLEVINS, 1993). Cependant, certaines évidences ont démontré la présence voir même la prédominance du récepteur CCK<sub>B</sub> chez différentes espèces, au cours du développement (GAGNON et al., 1994; MORISSET et al., 1999) et pendant l'instauration de la carcinogénèse (SMITH et al., 1995; TOWNSEND et al., 1988; WALSH, 1994; WATSON et al., 1989a; WATSON et al., 1989b). Dans le pancréas de veau et de porc, l'expression du récepteur CCK<sub>B</sub> surpasse celle du récepteur CCK<sub>A</sub>, mais sa présence n'a toujours pas clairement été associée à des événements physiologiques dont la sécrétion pancréatique (LE MEUTH et al., 1993; MORISSET et al., 1996; PHILIPPE et al., 1997). Plusieurs équipes de recherche ont observé l'abondance du messenger du récepteur CCK<sub>B</sub> (CLERC et al., 1997; DENYER et al., 1994; PISEGNA et al., 1992) et de site de liaison à celui-ci au niveau du tissu pancréatique humain (FUNAKOSHI et al., 1999). Toutefois, nombre de données pharmacologiques supportent l'implication du récepteur de type A dans l'activation de la sécrétion pancréatique amenée par la CCK (SOUDAH et al., 1992).

Contrairement au récepteur de type B, le récepteur CCK<sub>A</sub> est présent en moins grandes concentrations dans le pancréas humain tel que démontré par autoradiographie ainsi qu'à l'aide de courbes de déplacement (TANG et al., 1996). Dans le but d'élucider la ou les fonctions physiologiques contrôlées par le récepteur CCK<sub>B</sub>, une équipe de recherche a mis au point un modèle de souris transgéniques exprimant le récepteur CCK<sub>B</sub> humain au niveau du pancréas exocrine. D'abord associé à la sécrétion enzymatique (SAILLAN-BARREAU et al., 1998), ce transgène (CCK<sub>B</sub> humain) a dès lors été démontré comme moins efficace à stimuler la synthèse protéique par l'entremise d'une voie p70 S6 kinase dépendante (DESBOIS et al., 1999). Celle-ci survient à des concentrations de gastrine de l'ordre de  $10^{-9}$  à  $10^{-8}$ M, suffisantes à l'occupation du récepteur CCK<sub>B</sub>. Par contre, la sécrétion enzymatique qui survient à des concentration de  $10^{-11}$  à  $10^{-9}$ M de gastrine démontre une sensibilité plus grande à la gastrine.

Cette réponse sécrétoire à la gastrine à des concentrations de l'ordre du pM ne correspond pas à ce qui est connu d'une réponse typique de la gastrine sur le pancréas normal de rat ou de souris où on observe des réponses à des concentrations de l'ordre de 10 et 100nM (GARDNER et JENSEN, 1980).



#### **1.4.7 SOURIS 'KNOCKOUT' : DÉFICIENCE EN CCK<sub>B</sub>**

Deux équipes de recherche travaillent de front dans le but d'élucider les fonctions physiologiques contrôlées par le récepteur CCK<sub>B</sub> chez des souris déficientes en ce type de récepteur. Ces souris se développent normalement malgré une hypergastrinémie et une atrophie marquée de la muqueuse gastrique signe du rôle important de ce récepteur dans la croissance de cette muqueuse *in vivo*. Elles présentent une forte augmentation du pH gastrique basal qui corrèle avec une diminution du nombre total de cellules ECL et pariétales responsables de cette réduction de production d'acide (LANGHANS et al., 1997). De plus, une diminution de la densité des cellules  $\delta$  à somatostatine et une augmentation du nombre de cellules à gastrine de concert avec l'élévation de gastrine circulante ont été observées dans l'antrum pylorique de ces souris 'knockout'. L'ensemble de ces résultats démontrent bien l'importance du récepteur CCK<sub>B</sub> dans le maintien de l'intégrité des fonctions cellulaires de la muqueuse gastrique (LANGHANS et al., 1997). Dans le but de vérifier si cette absence de récepteur CCK<sub>B</sub> pouvait aussi affecter la physiologie pancréatique, MIYASAKA et al., (1999) ont procédé à l'examen des fonctions pancréatiques de souris 'knockout' pour le récepteur CCK<sub>B</sub>.

Leurs expériences ont permis de démontrer qu'aucune différence significative permettait de discriminer les souris 'knockout' des souris normales et ce, pour chacun des paramètres étudiés ; 1) la relâche d'amylase *in vitro*, 2) la sécrétion d'amylase et de bile *in vivo*, 3) le poids pancréatique, 4) le contenu total en protéines et 5) l'histologie tissulaire. Donc, le récepteur CCK<sub>B</sub> ne joue aucun rôle physiologique sur la sécrétion pancréatique ou biliaire et n'est pas associé à la croissance du pancréas exocrine chez la souris.

## **1.5 OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE**

Suite à toutes ces informations, il nous a paru important d'identifier et de caractériser d'avantage la présence ainsi que les niveaux d'expression des récepteurs CCK<sub>A</sub> et CCK<sub>B</sub> au niveau du pancréas en vue de mieux comprendre l'implication de la CCK et de la gastrine dans le maintien des fonctions pancréatiques au cours du développement de cet organe chez le rat ainsi que chez l'humain, le porc et la souris. Tout d'abord, nous envisageons évaluer les niveaux d'expression (ARNm, protéines) de chacun de ces récepteurs pour ensuite en déterminer la localisation cellulaire dans le pancréas de rat ainsi que chez l'humain, le porc et la souris pour faire suite aux résultats déjà décrits dans la littérature faisant part de la présence et de la localisation cellulaire de ces récepteurs chez différentes espèces.

D'autre part, puisque la gastrine a déjà été identifiée dans le pancréas fœtal humain ainsi que chez celui du rat à la période périnatale (LARSSON et al., 1977, LARSSON et al., 1979a) et qu'elle lie de façon spécifique le récepteur CCK<sub>B</sub> nous croyons qu'il serait important de vérifier s'il existe une corrélation entre les niveaux d'expression de cette hormone et ceux de son récepteur dans le pancréas de rat. Selon nous, au cours de la période fœtale et périnatale du développement pancréatique chez le rat, la gastrine pancréatique assurerait la croissance du pancréas via l'occupation du récepteur CCK<sub>B</sub>. Suivant cette période du développement, l'expression du récepteur CCK<sub>B</sub> disparaîtrait simultanément avec celle de la gastrine pour laisser place à l'expression de récepteur CCK<sub>A</sub>, dont l'activité (croissance et sécrétion) serait régie par la CCK duodénale. Il en serait de même chez la souris. Toutefois, chez l'humain et le porc, la sécrétion pancréatique serait plutôt sous le contrôle du récepteur CCK<sub>B</sub> déjà décrit comme étant exprimé au niveau des cellules acinaires pancréatiques humaines d'abord par autoradiographie (TANG, et al., 1996) ainsi qu'à l'aide d'études de sécrétion enzymatiques réalisées à l'aide d'acini pancréatiques de porc (MORISSET et al., 1996). C'est dans cet ordre d'idée qu'il serait important d'identifier la ou les fonctions biologiques associées à l'occupation de ces récepteurs, en l'occurrence le récepteur CCK<sub>A</sub> et spécialement le récepteur CCK<sub>B</sub> dont les niveaux d'expression chez plusieurs grands mammifères suffisent à lui octroyer une importance particulière qui reste cependant à être clarifiée.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Animaux

Nos protocoles expérimentaux ont été réalisés chez des rats albinos de souche Sprague Dawley mâles (180-200g) et femelles (250-300g) de la compagnie Charles River ainsi que sur leur progéniture. Ces rats ont été maintenus dans une atmosphère à température, humidité et luminosité contrôlées respectivement de 21°C, 40% avec une période de clarté de 12h s'étalant de 7h00 à 19h00. Ces animaux étaient nourris *ad libitum* au Purina Rat Chow (formule 5012 contenant 22.5% de protéines) et sevrés 21 jours après leur naissance.

Des morceaux de tissus pancréatiques de souris adultes, de porcs adultes et de fœtus humains de 20 semaines ont aussi été utilisés à titre d'éléments de comparaison. L'utilisation de spécimens humains fut approuvée par le comité d'éthique institutionnel sur la recherche chez l'humain (Centre Universitaire de Santé de l'Estrie). Aucun tissu provenant de cas de malformations humaines ou de morts fœtales n'a été utilisé.

## **2.2 Méthodologie**

### **2.2.1 Sacrifice et prélèvement**

Les rats ont été sacrifiés par décapitation de même que les femelles et ce, après 21 jours de gestation, alors que certaines ont poursuivi leur gestation jusqu'au moment de mettre bas et leurs petits ont été sacrifiés à la naissance ainsi qu'aux jours 3, 5, 10, 15, 20, 25, et 35 suivant celle-ci.

Les organes (cerveau, fundus gastrique, antrum pylorique) ont rapidement été prélevés en débutant par le pancréas. Une fois dépourvus de tissu adipeux, certains échantillons ont été immédiatement (1) submergés et maintenus dans l'azote liquide jusqu'au moment de l'extraction des ARNs totaux pour d'éventuelles analyses d'ARNm (ARNs messagers); (2) d'autres ont été plongés dans l'O.C.T. (Optimum Cutting Temperature Embedded Compound, Tissus Tek, Miles Laboratory) et enfin être gelés dans l'azote liquide pour des expériences d'immunofluorescence indirecte et enfin, certains ont été homogénéisés puis fractionnés pour fins d'analyses de protéines spécifiques.

### **2.2.2 Extraction des ARNs totaux**

La verrerie utilisée au cours de cette extraction des ARNs a d'abord été stérilisée 2h à 200°C pour éliminer toute trace potentielle d'ARNase. Les solutions utilisées ont aussi toutes été préparées à partir d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) 0.1% puis autoclavées. De plus, vue la haute teneur en ARNase présente dans le pancréas, l'extraction des ARNs totaux a été réalisée selon la technique décrite par CHIRGWIN et al., (1979) avec certaines modifications.

Brièvement, le tissu (~200 mg) a été homogénéisé à vitesse maximale pendant 60 secondes à l'aide d'un polytron (Kinetica) dans 10 volumes d'une solution de thiocyanate de guanidine 4M (Fluka) contenant 0,1M de Tris-HCl pH 7.5 et 0,14M de  $\beta$ -mercaptoéthanol. L'homogénat a alors été incubé à température de la pièce avec 0,5 volume d'une solution de sarcosyl 10% pour ensuite être mélangé quelques secondes avant d'être finalement centrifugé (5 min, 5000g, 4°C). Le surnageant a ensuite été récupéré et 400 $\mu$ l d'acide acétique 1M puis 250 $\mu$ l d'acétate de potassium 2M pH 5,5 y ont été ajoutés. On a alors laissé l'échantillon précipiter 2h à -20°C en y ajoutant 0,75 volume d'EtOH 100% froid. Suite à cette première précipitation, l'échantillon a été centrifugé (10 min, 10 000g, 4°C). Le culot a été resuspendu dans 5ml d'une solution d'hydrochlorure de guanidine 7,5M pH 7,0 (Fluka) contenant 0,1M de  $\beta$ -mercaptoéthanol.

Par la suite, 250µl d'acétate de potassium 2M pH 5,5 ont été ajoutés en vue de neutraliser le pH de l'échantillon. Toutes les étapes qui suivent la première précipitation ont été répétées une seconde fois et finalement, l'échantillon a été placé à -20°C pour la nuit.

La deuxième partie de cette extraction a permis de déprotéiniser l'échantillon d'ARN. Tout d'abord, l'échantillon a été centrifugé (10 min, 10 000g, 4°C). Le culot ainsi obtenu a été lavé avec 5ml d'EtOH 70% froid et recentrifugé sous les mêmes conditions. Il a ensuite été resuspendu dans 4 ml d'une solution d'EDTA 20mM pH 7,0 contenant 0,1% SDS et incubé à 60°C pour une période de 4 min sous forte agitation. Deux volumes d'une solution de chloroforme et de 1-butanol (4 :1 v/v) ont alors été ajoutés à l'échantillon pour ensuite être mélangés au vortex pendant 5 min pour finalement être centrifugés (5min, 8000g, 4°C) 'étape de déprotéinisation'. La phase aqueuse a alors été récupérée et l'ARN a été précipité avec l'ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 2M pH 7,0 et de 2,5 volumes d'EtOH 100% froid. L'échantillon a alors été incubé à -20°C pour la nuit. Celui-ci a finalement été centrifugé (15min, 10 000g, 4°C), l'ARN séché puis resuspendu dans un volume approprié d'eau DEPC selon la quantité de ce dernier (la totalité de cette procédure ayant lieu sur glace). Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à leur usage ultérieur.

### **2.2.3 Quantification et contrôle de la qualité de l'ARN**

Une fois l'extraction complétée, chacun des échantillons d'ARN a été quantifié par mesure au spectrophotomètre (Beckman Du-65) de la densité optique à 260nm correspondant au maximum d'absorption des nucléotides. Une densité optique de 1 à 260nm correspond à une concentration de 40µg d'ARN/ml. Le calcul du rapport de la densité optique de 260nm/280nm (maximum d'absorption des nucléotides / maximum d'absorption des protéines) a permis d'évaluer le niveau de pureté de chacun des échantillons d'ARN, où un rapport de 1,6 à 2,0 correspond à un échantillon relativement pur (GLASEL, 1995), donc dépourvu de protéines.

L'intégrité de l'ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dénaturant contenant 1X MOPS (0,2M MOPS pH 7,0, 50mM acétate de sodium, 10mM EDTA, pH 8,0) et 2,2M de formaldéhyde. Le tampon de migration utilisé était composé de 1X MOPS et de 2,2M de formaldéhyde (LEHRACH et al., 1977; SAMBROOK et al., 1989). Les échantillons ont alors été colorés au bromure d'éthidium (0.5mg/ml) puis les ARNs ribosomaux 28S et 18S ont été visualisés sous rayons U.V. (Transilluminator, FisherBiotech) et photographiés à l'aide d'une camera polaroid (FisherBiotech). Les échantillons d'ARN sélectionnés ont été entreposés à -80°C jusqu'à leur utilisation.



#### **2.2.4 Transfert de l'ARN sur membrane de nylon**

Les ARNs totaux ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dénaturant contenant 1X MOPS (0,2M MOPS pH 7,0, 50mM acétate de sodium, 10mM EDTA, pH 8,0) et 2,2M de formaldéhyde dans une chambre à électrophorèse contenant un tampon de migration constitué de 1X MOPS et de 2,2M de formaldéhyde. À chacun des 20µg d'ARN totaux déposés dans les puits, s'ajoutaient 6µl d'une solution de 1X MOPS et de 50% formaldéhyde (v/v). L'échantillon a alors été incubé à 60°C, 10 min puis refroidi sur glace et 8µl d'une solution composée de formaldéhyde 37%, de bleu de bromophénol 0,4% et de xylène cyanol 0,4% ont été ajoutés (SAMBROOK et al., 1989). Maintenant prêts pour le chargement, les échantillons ont été déposés dans les puits déjà submergés de tampon de migration. La migration a été réalisée à 25 volts pour une durée de 16h.

Une fois cette étape terminée, le gel a été submergé sous agitation douce dans de l'eau DEPC pour une période de 15 min afin d'éliminer toute trace de formaldéhyde. Le transfert des ARNs a été effectué par pression sous vide à l'aide d'un appareil de transfert (Model 785 Vacuum blotter, Biorad) directement sur des membranes de nylon non-chargées Hybond-N (Amersham Life Science).

Le transfert, réalisé sur une période de 3h15 à pression de 1,5mm de Hg en présence de 20X SSC (3M NaCl, 0,3M citrate de sodium) pH 7,0 a été interrompu 1h après son départ pour procéder à l'hydrolyse des gros fragments d'ARN contenus dans le gel (SAMBROOK et al., 1989; CHEVET et al., 1995). Le gel a alors été recouvert avec la solution d'hydrolyse contenant 50mM NaOH et 10mM de NaCl pour 10 min puis recouvert à nouveau avec une solution de neutralisation de 0,1M Tris, pH 7,4 pour 10 autres minutes.

Une fois le transfert terminé, les membranes ont été déposées dans une solution de 6X SSC pH 7,0 pour rinçage puis examinées sous U.V. pour vérifier la qualité du transfert. Les ARNs ont ensuite été immobilisés à la membrane par irradiation aux U.V. avec une dose de 120mJ/cm<sup>2</sup> délivrée par une source lumineuse ultra violette calibrée (GS Gene Linker<sup>TM</sup> UV Cross Linker, Biorad). Les membranes ont par la suite été conservées sous vide à 4°C jusqu'à leur utilisation.

### **2.2.5 Analyse par buvardage Northern**

L'électrophorèse sur gel de l'échantillon, le transfert de l'ARN sur membrane, son immobilisation à la membrane, l'hybridation ainsi que l'autoradiographie constituent les différentes étapes menant à l'analyse du niveau d'expression d'un gène par buvardage Northern.

### **2.2.5.1 Préparation des sondes**

Toutes les procédures qui ont conduit à l'élaboration des différentes sondes d'ARNc (PCR, clonage, transformation, préparation de cellules compétentes, maxi-préparations d'ADN plasmidique, isolement d'ADN plasmidique) furent tirées des méthodes décrites par SAMBROOK et al., 1989.

### **2.2.5.2 Description des sondes**

La sonde d'ARNc du récepteur CCK<sub>A</sub> a été transcrite à partir d'un fragment d'ADNc de 256pb (résidus 5'-168 à 424-3') de la région codante du récepteur CCK<sub>A</sub> de rat, amplifié par PCR (SAMBROOK et al., 1989) à l'aide d'amorces sens et antisens, composées respectivement des sites de restriction SacI et KpnI ; 5'-AATGAGCCATTCACGAGCTCGCC-3' (résidus 153 à 175) et 5'-GCTTTGTTCTCCTACGCCTGCCATGGAA-3' (complémentaire aux résidus 400 à 427). L'ADNc simple brin 'reverse transcribed' à partir d'ARN de pancréas de rat, a servi de matrice pour l'amplification.

La même procédure a été utilisée pour la construction de la sonde de la gastrine. À l'aide d'amorces sens et antisens, composées des sites de restriction KpnI et SacI respectivement. Ces amorces ; 5'-TGCTGGCTCTAGGTACCTTCTCGG-3' (résidus 80 à 103) et 5'-GATGGCTGAGCTCTGGAAGAGC-3' (complémentaire aux résidus 365-386) ont servi à amplifier une portion codante de la gastrine de rat (résidus 5'-96 à 376-3'). L'ADNc simple brin 'reverse transcribed' à partir d'ARN de cerveaux de rat a servi de matrice pour cette amplification. Ces produits d'amplification (ADNc du CCK<sub>A</sub> et de la gastrine) ont tous deux été digérés avec les enzymes de restriction SacI et KpnI puis finalement clonés dans le vector pBluescript II SK (Stratagene).

Finalement, un fragment de 490pb de la séquence codante du récepteur CCK<sub>B</sub> de rat (résidus 5'-207 à 697-3') (WANK et al., 1992a) a été digéré avec les enzymes de restriction SmaI et KpnI puis sous-cloné dans le vecteur pBluescript II SK (Stratagene).

Ces trois clones ont été utilisés pour le séquençage (Sequencing<sup>TM</sup> Kit, Pharmacia, Biotech) et pour la transcription in vitro de sondes d'ARNc avec utilisation de l'ARN polymérase T3 (sonde du récepteur CCK<sub>A</sub>) ou T7 (sonde du récepteur CCK<sub>B</sub> et de la gastrine) tel que décrit par Riboprobe System (Promega).

### 2.2.5.3 Synthèse des sondes

La transcription *in vitro* des sondes d'ARNc a été effectuée comme suit : à 1µg d'ADN linéarisé (matrice de la synthèse), ont été ajoutés dans l'ordre : 4µl de tampon de transcription (Tris-HCl 200mM, pH7,5, MgCl<sub>2</sub> 30mM, spermidine 10mM, NaCl 50mM), 2µl DTT 100mM, 0,8µl RNAGuard<sup>R</sup> (20U), 1µl d'une solution de nucléotides (ATP, GTP, CTP) à une concentration finale de 2,5mM chacun, 2.4µl d'UTP 100µM, 5µl [<sup>32</sup>P] UTP 10mCi/ml (pb10203, Amersham, Life Science) ainsi que 1µl d'ARN polymérase (T3, T7 ou SP6 selon le promoteur utilisé).

Le tout a été incubé à 37°C pendant 1h15, puis 1µl de DNase I (Pharmacia) a été ajouté à l'échantillon qui a de nouveau été incubé 15 min à 37°C dans le but de détruire la matrice d'ADN ayant servi à la transcription (Riboprobe System, Promega). Une fois le volume de la réaction complété à 100µl, la préparation a été dépourvue des nucléotides radiomarqués non incorporés en cours de synthèse à l'aide d'une colonne de résine Sephacryl<sup>TM</sup> (MicroSpin<sup>TM</sup> S-200 HR, Pharmacia).

La synthèse de la sonde ADN ribosomal 18S a été réalisée comme suit : à 1µg d'ARN ribosomal 18S, ont été ajoutés 5µl de pd(N)6 (2,5µg/µl), 4µl de tampon RT 5X (Reverse Transcription, Proméga) (Tris-HCl 50mM, pH 8,8, KCl 250mM, Triton 100X 1%) ainsi que de l'eau DEPC pour compléter le volume de la réaction à 14µl final. La préparation a alors été incubée 5 min à 100°C, transférée sur glace 5 min, de nouveau incubée 5 min à température de la pièce et finalement 30 min à 14°C. Ont ensuite été ajoutés dans l'ordre : 5µl d'une solution de nucléotides (ATP, CTP, GTP, TTP) à une concentration finale de 2,5mM chacun, 6µl de tampon RT 5X, 0,8µl de RNAGuard<sup>R</sup> (20U), 2,5µl [<sup>32</sup>P] CTP 10mCi/ml (AA0005, Amersham, Life Science), 2µl de Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Promega) et de l'eau DEPC pour compléter le volume de la réaction à 50µl. La préparation a alors été incubée 1h à 37°C. Dès lors, 50µl d'eau DEPC ont été ajoutés à la préparation. Celle-ci a ensuite été dépourvue des nucléotides radiomarqués non incorporés en cours de synthèse à l'aide d'une colonne de résine Sephacryl<sup>TM</sup> (MicroSpin<sup>TM</sup> S-200 HR, Pharmacia). Avant son utilisation, la sonde d'ADN ribosomal 18S a été bouillie 5min puis rapidement transférée sur glace dans le but de dissocier les doubles brins d'ADN qui la composent et ainsi permettre l'hybridation de la sonde avec toutes séquences complémentaires présentes lors de la réaction d'hybridation.

#### **2.2.5.4 Préhybridation, hybridation, lavages et exposition**

Les membranes de nylon ont été préhybridées pour une période de 4 à 6h à 65°C pour une sonde d'ARN et à 42°C pour une sonde d'ADN ribosomal 18S dans une solution composée de 50% formaldéhyde (v/v), 5X SSC, HEPES 50mM, pH 6,8, Denhardt 5X, EDTA 2mM, d'ADN de sperme de saumon (200ug/ml) et de SDS 5%. La sonde radiomarquée ( $1 \times 10^6$  cpm/ml) a été ajoutée à la solution de préhybridation pour la période d'hybridation effectuée suivant les mêmes conditions pour une période de 16h.

À la suite de cette hybridation, les membranes ont été lavées (les conditions de lavage variant selon la sonde utilisée). Les membranes hybridées avec une sonde d'ARN ont été lavées 90 min à 65°C dans une solution de 0,5X SSC (NaCl 75mM, citrate de sodium 7,5mM) et de SDS 0,1% 60 min à 70°C dans une solution de 0,1X SSC (NaCl 15mM, citrate de sodium 1,5mM) et de SDS 0,1%, 30 min à 75°C dans une solution de 0,1X SSC et SDS 0,1% et finalement 30 min à 80°C dans une solution de 0,1X SSC et SDS 0,1%. Les membranes hybridées avec la sonde d'ARN ribosomal 18S ont été lavées 90 min dans une solution de 0,1X SSC et SDS 0,1%. Une fois les lavages terminés, chacune des membranes a été exposée en présence d'un film Kodak Biomax MS à -80°C pour des périodes de temps variant selon la sonde utilisée.

### 2.2.6 Amplification d'ADN

Les échantillons d'ADNc ont été synthétisés à partir de 5µg d'ARN total à l'aide d'oligo(dt) et d'une trousse de synthèse d'ADNc (Pharmacia Biotech kit). Pour chacune des réactions d'amplification PCR, 0.5µg d'ARN total 'reverse transcribed' servant de matrice à la réaction d'amplification par PCR, ont été utilisés en présence de 2 unités de Taq polymérase (Pharmacia Biotech), des amorces sens et antisens du récepteur CCK<sub>B</sub> ; 5'-CTTCATCCCGGGTGTGGTTATTGCG-3' (correspondant aux nucléotides 816 à 840) et 5'-CCCCAGTGTGCTGATGGTGGTATAGC-3' (nucléotides 1460 à 1485) respectivement utilisés à une concentration de 2.5mM chacune dans 50µl d'une solution de 67mM Tris-HCl, pH 8.8, 16mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, des déoxyribonucléotides, 0.25mM chacun et du Tween 20 (0.01% vol/vol).

Les paramètres d'amplification étaient de 94°C pour 30 sec, 57°C pour 30 sec puis 72°C pour 30 sec. Les amorces utilisées pour l'amplification d'ADN ont été synthétisées par GIBCO (Life Technologies). Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'acrylamide coloré au bromure d'éthidium.



### **2.2.7 Extraction, fractionnement et dosage des protéines**

Des tissus pancréatiques fœtaux humains, de porcs, de souris et de rats fraîchement prélevés ont été homogénéisés dans un tampon d'homogénéisation (10mM HEPES, pH 7,5, 50mM sucrose, 1mM EDTA pH 8,0, 1mM EGTA, 0,5mM PMSF, 21 $\mu$ M Leupeptine, 1,5 $\mu$ M Aprotinine) à une concentration finale de 20%.

Après une première centrifugation (5 min, 500g, 4°C), le surnageant obtenu a été centrifugé de nouveau (30 min, 30 000g, 4°C). Le culot résultant de cette centrifugation a ensuite été resuspendu dans un volume approprié de tampon d'homogénéisation et utilisé à titre de fractions membranaires brutes. Les échantillons ont alors été maintenus à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les contenus en protéines de ces échantillons ont été déterminés selon l'essai Pierce à l'aide d'acide dicinchoninique (Pierce, Life Sciences Company).

### **2.2.8 Migration et transfert des protéines**

Les fractions membranaires brutes des tissus des différentes espèces ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide dénaturant contenant (0,375M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 8% polyacrylamide, 0,2% Temed (v/v) (Biorad), 0,2% ammonium persulfate).

C'est dans une chambre à électrophorèse contenant un tampon de migration constitué de 25mM Tris-base, 192mM glycine et de 3,5mM SDS que les protéines ont été séparées. Chaque échantillon déposé dans les puits contenait 30µg de protéines auxquels s'ajoutaient 33,3% (v/v) d'un tampon Laemmli (62.5mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% glycérol (v/v), 2% SDS, 5% β-mercaptoéthanol, 0,0001% bromophénol bleu). L'échantillon a alors été incubé à 100°C pour une période de 5 min puis refroidi sur glace (SAMBROOK et al., 1989). Maintenant prêt pour le chargement sur gel, les échantillons ont d'abord été déposés dans les puits dépourvus de tampon de migration et ont ensuite été recouverts de ce dernier. La migration a été réalisée à 450 volts, 20 milliampères / petit gel jusqu'au moment où le front de migration, correspondant au bromophénol bleu s'échappait du gel. Une fois cette étape terminée, le gel a été immergé dans un tampon de transfert (25mM Tris, pH 8,3, 192mM glycine). Le transfert des protéines a été réalisé à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (Transfert Blot SD, Biorad) directement sur des membranes de PVDF de 0,22µM (Biorad). Le transfert a été effectué sur une période de 60 min (30 volts, 450 milliampères, 3,6 de puissance / petit gel). Une fois celui-ci terminé, les membranes ont été séchées puis conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

### **2.2.9 Analyse par buvardage Western et Immunoneutralisation**

Les membranes de PVDF ont d'abord été incubées dans une solution de saturation TBST (20mM Tris, pH 7,4, 0,1% Tween-20 (v/v), 137mM NaCl,) supplémentée de 6% de lait en poudre pour une période de 2h à 4h à la température de la pièce. Elles ont ensuite été submergées dans le TBST (3% lait en poudre) auquel a été ajouté l'anticorps primaire à une concentration finale donnée et ce, sous faible agitation pour une période de 16h à 4°C. Les membranes ont alors subi cinq lavages de 5 min dans le TBST sous forte agitation pour finalement être mises en contact avec l'anticorps secondaire (Rabbit IgG, Horseradish Peroxydase Linked F(ab)<sub>2</sub> from Dunkey, Amersham) dilué (1 : 10 000) dans le TBST (3% lait en poudre) pour 1h à la température de la pièce, suivi de six lavages de 5 min au TBST. Les protéines ayant été reconnues par l'anticorps primaire ont été visualisées par chemiluminesce (Lumi Light Plus, Boehringer Mannheim) et leur taille a été évaluée à l'aide d'une échelle de marqueurs de poids moléculaire (Biorad).

Le marquage spécifique obtenu à l'aide des anticorps primaires a pu être immunoneutralisé par préabsorption de ces derniers en présence de 10µg/ml d'antigène peptidique correspondant, dans une solution de TBST (3% lait en poudre) pour 1h à température de la pièce.

Voici, de façon plus détaillée, la dilution de chacun des anticorps utilisés au cours de cette procédure : CCK<sub>A</sub> #1122, 1:1000; CCK<sub>B</sub> #9413, 1:5000; CCK<sub>B</sub> #9252, 1:5000 et l'anticorps CCK<sub>B</sub> #9262, 1 : 10 000.

### **2.2.9.1 Description des Anticorps primaires**

L'antisérum CCK<sub>A</sub> de lapin #1122 utilisé ici a été conçu pour interagir contre un peptide synthétique identique à la région c-terminale (Cys410 411-429) du récepteur CCK<sub>A</sub> de rat. Il nous a été offert par Dre M.-L. Kruse (Medizinische Klinik der CAU Kiel, D-24105 Kiel, Germany).

L'antisérum CCK<sub>B</sub> de lapin #9413 a été construit contre une séquence peptidique correspondant à une portion de la troisième boucle intracellulaire (252-266) du récepteur CCK<sub>B</sub> de rat. Les antiséras CCK<sub>B</sub> de lapin #9262 et #9252 ont tous deux été conçus pour interagir contre des peptides analogues aux séquences (42-55) et (253-264) correspondant, respectivement, à la région N-terminale ainsi qu'à une portion de la troisième boucle intracellulaire du récepteur CCK<sub>B</sub> de chien. Les anticorps CCK<sub>B</sub> présentés ci-dessus proviennent du Center for Ulcer Research and Education de Los Angeles, CA et nous ont été offerts par le Dr John H. Walsh grâce à un octroi : Antibody RIACore, NIH grant #DK41301.

L'antisérum de gastrine de lapin # 8007 dirigé contre le pentapeptide C-terminal commun de la gastrine et de la cholécystokinine (Gly-Trp-Mét-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>) de rat nous a été offert par le Dr Jens F. Rehfeld de Copenhague au Danemark. Les anticorps construits pour interagir contre la somatostatine, le glucagon ainsi que le polypeptide pancréatique nous ont été offerts par le Dr Denis Le Bel du département de Biologie de l'Université de Sherbrooke alors que l'anticorps dirigé contre l'insuline fut un cadeau du Dr Moïse Bendayan de l'Université de Montréal.

#### **2.2.10 Immunofluorescence indirecte**

Des cryosections de 4-5µm réalisées à l'aide d'un cryostat (Jung Frigocut 2800<sup>N</sup>, Leica) ont été déposées sur des lames chargées puis séchées à l'air libre 30 min avant leur entreposage à -80°C. Cette procédure débute par une fixation des cryosections dans un tampon phosphate (PBS) (0,14M NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 7,4, 2% formaldéhyde pour une période de 45 min à 4°C puis les coupes ont été lavées à deux reprises au PBS. Elles ont alors été perméabilisées dans une solution de PBS, 0,25% Triton X-100 puis lavées de nouveau au PBS.

Par la suite, les résidus aldéhydes contenus dans les coupes de tissu pouvant interagir de façon non-spécifique avec les anticorps ont été éliminés par incubation dans une solution de PBS, 100mM glycine 10 min à la température de la pièce. Les coupes ont alors été saturées dans une solution de PBS contenant 2% sérum de chèvre (ICN Biomedical) pour une période de 30 min. Les sections de tissu ont dès lors été mises en contact avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de PBS, 2% sérum de chèvre pour un minimum de 2h (2h à 16h) puis lavées 3 fois 5 min au PBS. Elles ont ensuite été incubées 1h en présence de l'anticorps secondaire jumelé à la fluorescéine (antirabbit IgG fluorescein F(Ab)<sub>2</sub> fragment, Cappel, ICN Biomedical) et lavées de nouveau au PBS pour plus de 15 min. Les lames ont finalement été montées à l'aide de lamelles dans le Fluoroguard (Biorad) et examinées sous un microscope à fluorescence (Reichert Polyvar 2, Leica) équipé pour l'épifluorescence. Pour réaliser ces observations, la fluorescéine a été excitée par l'émission d'un faisceau lumineux (Osram HBO 100 W/2 lamp, Leica) traversant un filtre de 450-495nm (B1 Module dichroic mirror<sup>DS</sup> 510, Barrier Filter, LP520, Leica). Les photos de ces observations ont été prises sur films Kodak TX-400. Voici de façon plus détaillée, la dilution de chacun des anticorps utilisés au cours de cette procédure: CCK<sub>A</sub> #1122, 1:100; CCK<sub>B</sub> #9262, 1:500; gastrine #8007, 1:100; somatostatine, 1:2000; glucagon, 1:50; polypeptide pancréatique, 1:2000 et l'anticorps dirigé contre l'insuline, 1:50.

## **CHAPITRE III**

### **RÉSULTATS**

#### **3.1 Expression du récepteur CCK<sub>A</sub>**

##### **3.1.1 Ontogénie de l'expression du récepteur CCK<sub>A</sub> dans le pancréas de rat**

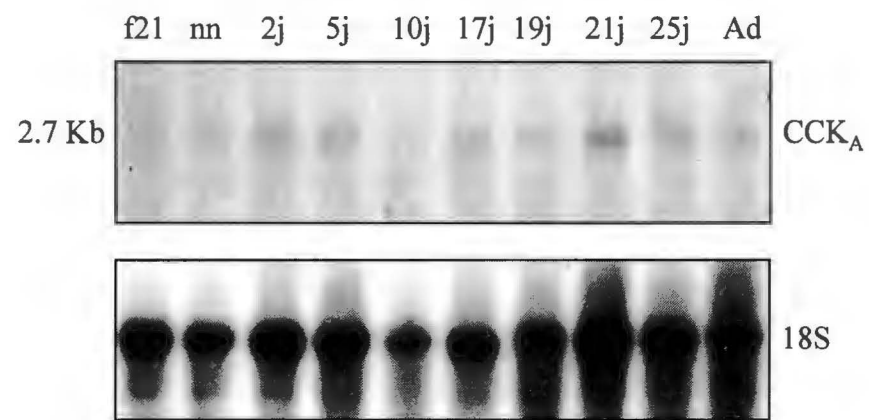
Telle que présentée à la figure 2A, l'analyse par buvardage Northern du niveau d'expression de l'ARNm du récepteur CCK<sub>A</sub> a permis d'identifier un transcrit d'environ 2.7Kb, déjà présent à un stade fœtal avancé (f21). Après la naissance, on observe deux hausses majeures d'expression soit 2 à 5 jours suivant la naissance de l'animal puis au moment de son sevrage (21j). Par la suite, son expression semble se stabiliser à un niveau moindre et ce, jusqu'à l'âge adulte (Figure 2B). À l'aide d'un anticorps dirigé contre la portion C-terminale (Cys 410, 411-429) du récepteur CCK<sub>A</sub> de rat, il a été possible de suivre, par buvardage Western, l'ontogénie de l'expression de la protéine de ce récepteur à partir de fractions membranaires pancréatiques brutes (Figure 3).

**Figure 2      Analyse par Northern de l'expression du récepteur CCK<sub>A</sub> du pancréas de rat.**

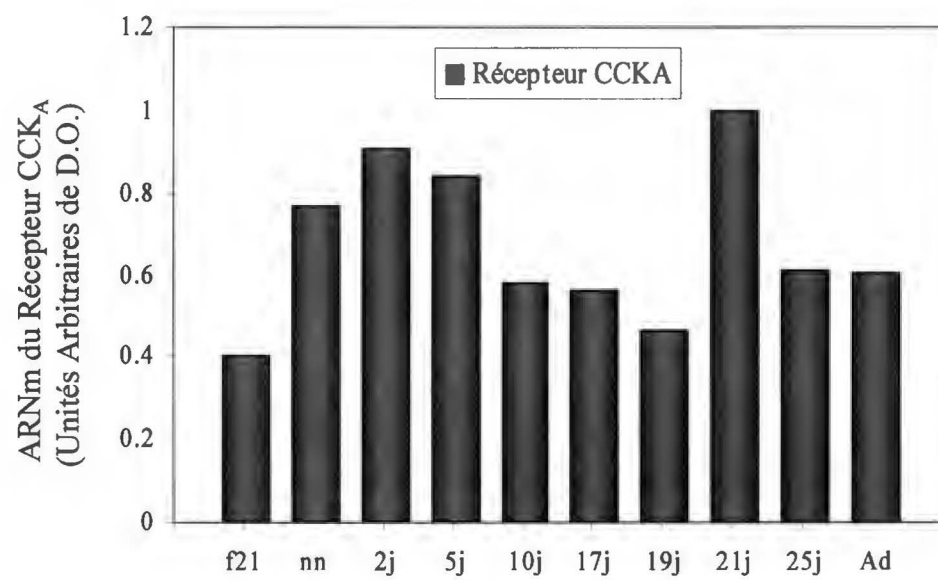
20µg d'ARN total de pancréas fœtal (f21) et postnataux (nn : nouveau- né, 2, 5, 10, 17, 19, 21, 25 jours, Ad : Adulte) de rat ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dénaturant et ont été hybridés à l'aide d'une sonde d'ARNc du récepteur CCK<sub>A</sub> marquée au <sup>32</sup>P. Une sonde d'ADNc de l'ARN ribosomal 18S a été utilisée dans le but d'évaluer la charge relative d'ARN transféré sur membrane (A). Un histogramme de l'abondance relative du messenger d'environ 2.7 Kb du récepteur CCK<sub>A</sub> à différents temps au cours du développement a été obtenu par photodensitométrie du transcrit. Chacune des valeurs obtenues a été normalisée selon l'abondance de l'ARN 18S correspondant (B). Les données présentées en (A) sont représentatives de trois échantillons de tissus pancréatiques issus de trois animaux différents pour chacun des temps étudiés.



A

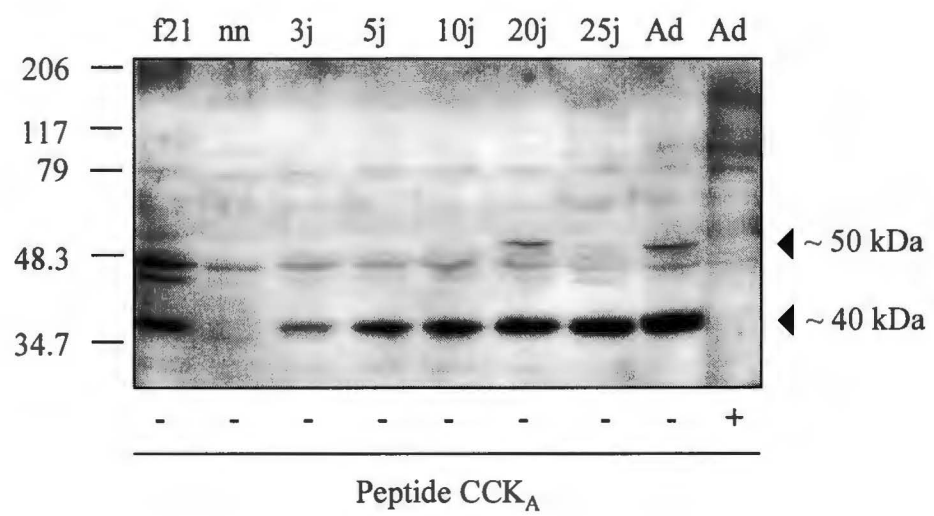


B



**Figure 3      Analyse par Western de l'expression du récepteur CCK<sub>A</sub> du pancréas de rat.**

30µg de protéines (fractions membranaires brutes) de pancréas fœtal (f21) et postnataux (nn : nouveau né, 3, 5, 10, 20, 25 jours, Ad : Adulte) de rat ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide SDS-PAGE 10% et révélées à l'aide de l'anticorps CCK<sub>A</sub> #1122 utilisé à une dilution de 1 : 1000, avant (-) ou après (+) une immunoneutralisation réalisée sur le tissu adulte, par préincubation de l'anticorps primaire 1h avec 10µg · ml<sup>-1</sup> d'antigène peptidique correspondant. Ces données sont représentatives de trois échantillons de tissus pancréatiques issus de trois animaux différents pour chacun des temps étudiés.



Une protéine d'environ 40kDa a pu être identifiée au niveau du pancréas fœtal de 21 jours, protéine dont l'expression diminue chez le nouveau-né (nn) pour ensuite augmenter de façon constante et atteindre un niveau maximal à l'âge adulte (Ad). La spécificité de cette protéine d'environ 40kDa du récepteur CCK<sub>A</sub> a été confirmée par disparition de cette bande par préabsorption (+) de l'anticorps avec l'antigène peptidique correspondant. Une seconde protéine d'environ 50kDa, n'apparaissant qu'au 20<sup>ième</sup> jour après la naissance a pu être identifiée, plus faiblement exprimée au 25<sup>ième</sup> jour puis exprimée à l'âge adulte à un niveau comparable à celui retrouvé au 20<sup>ième</sup> jour après la naissance. À nouveau, la spécificité de cette isoforme de la protéine du récepteur CCK<sub>A</sub> a été confirmée par disparition de la bande d'environ 50kDa par préabsorption de l'anticorps avec l'antigène peptidique correspondant. Par immunofluorescence indirecte (Figure 4), la présence du récepteur CCK<sub>A</sub> a pu être identifiée à chacun des âges étudiés. Quoique l'intensité de marquage au niveau du pancréas nouveau-né (nn) et de 5 jours eut été légèrement plus faible en comparaison avec les autres âges étudiés, l'immunoréactivité de cet anticorps pour la protéine du récepteur CCK<sub>A</sub> a clairement pu être localisée au pourtour des cellules acinaires. L'intensité du marquage augmente avec l'âge, confirmant ainsi les résultats déjà obtenus par analyse Western ; un niveau d'expression qui atteint un maximum à 20 jours avec un marquage majoritairement retrouvé au niveau des membranes plasmiques des cellules acinaires.

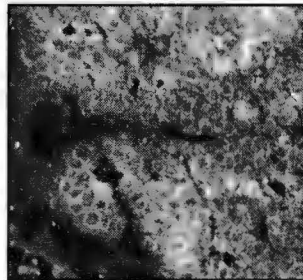
**Figure 4      Immunofluorescence indirecte du récepteur CCK<sub>A</sub> au cours du développement pancréatique de rat.**

Des cryosections de 4-5µm ont été marquées à l'aide de l'anticorps CCK<sub>A</sub> #1122 utilisé à une dilution de 1 : 100, puis révélées à l'aide d'un anticorps secondaire jumelé à la fluorescéine. Un contrôle négatif de la réaction a été obtenu à l'aide d'un sérum préimmun (SPI).

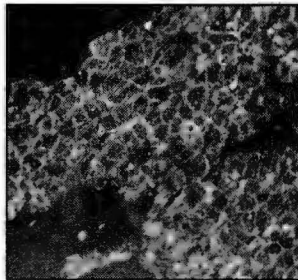
f21 : pancréas fœtal de 21 jours; nn : pancréas nouveau né; 5j, 10j, 20j, 25j, Adulte, âges des animaux après la naissance.

(grossissement de l'objectif 40X)

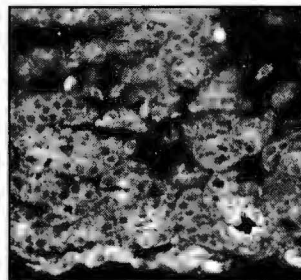
f21



nn

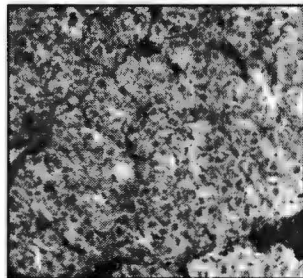


5j

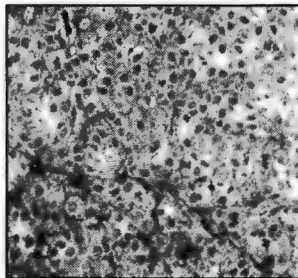


136X

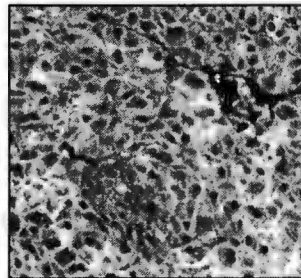
10j



20j

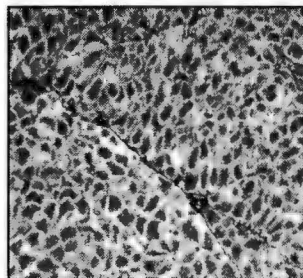


25j

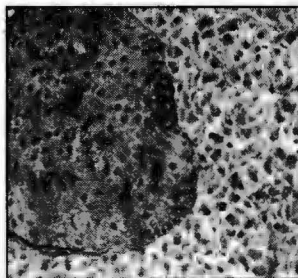


136X

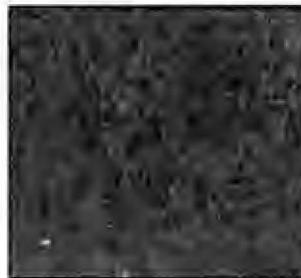
Adulte



Adulte



SPI



136X

Toutefois, dans le pancréas adulte, la présence du récepteur CCK<sub>A</sub> a aussi été identifié avec une intensité de marquage beaucoup plus faible au niveau des îlots de Langerhans, plus précisément au centre de ceux-ci où sont retrouvées les cellules  $\beta$  à insuline. La spécificité de ce marquage a pu être confirmée par l'utilisation d'un sérum préimmun (SPI) à titre de contrôle négatif de la réaction.

### **3.1.2 Expression du récepteur CCK<sub>A</sub> dans le pancréas fœtal et adulte humain, de porc et de souris**

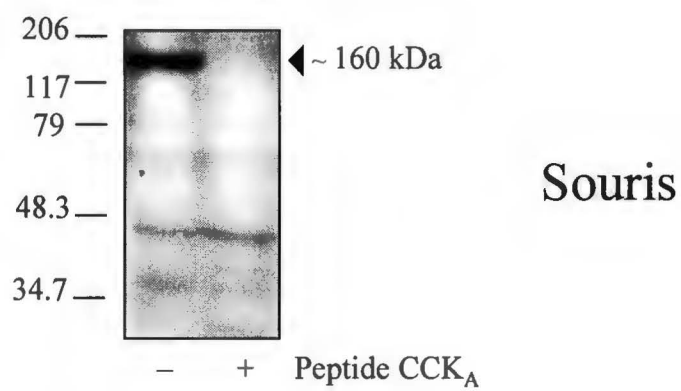
Dans le but de vérifier la présence du récepteur CCK<sub>A</sub> chez différentes espèces mise à part le rat (Figure 5), des analyses par buvardage Western ont été réalisées et celles-ci ont permis d'identifier, à l'aide du même anticorps utilisé précédemment chez le rat (CCK<sub>A</sub> #1122 ; Cys 410, 411-429), une protéine d'environ 160kDa à partir de fractions membranaires pancréatiques brutes de souris et de porc. Par préabsorption (+) de l'anticorps avec l'antigène peptidique correspondant, la spécificité de ces bandes a été confirmée. Par contre, au niveau du pancréas humain, seule une bande d'environ 45kDa a été reconnue de façon spécifique par cet anticorps.

**Figure 5      Analyse par Western du récepteur CCK<sub>A</sub> de souris (A), de porc (B) et de fœtus humain (20 semaines) (C).**

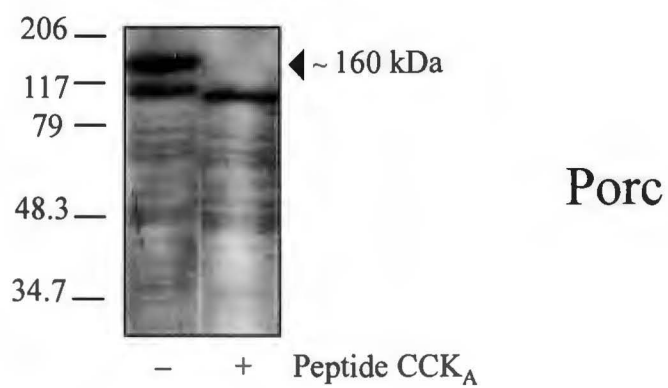
L'anticorps CCK<sub>A</sub> #1122 (1 : 1000) a été utilisé pour révéler 30µg de protéines membranaires de pancréas de souris (A), de porc (B) et de fœtus humain (C) séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide SDS-PAGE 10%, avant (-) ou après (+) une immunoneutralisation réalisée par préincubation de l'anticorps primaire 1h avec 10µg · ml<sup>-1</sup> d'antigène peptidique correspondant.



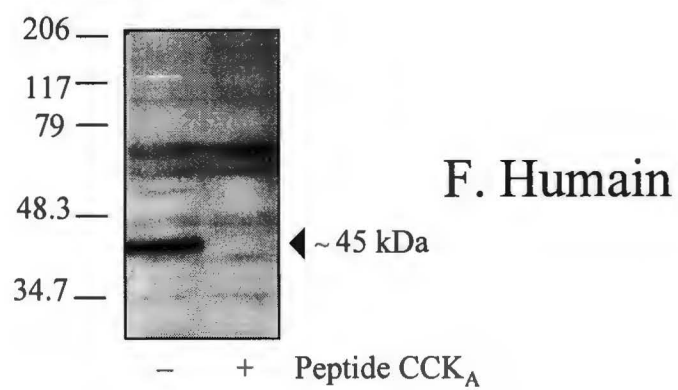
A



B



C



Chez ces trois espèces, la distribution du récepteur CCK<sub>A</sub> diffère considérablement (Figure 6). En effet, tel qu'observé dans le pancréas de rat, le pancréas de souris exprime majoritairement le récepteur CCK<sub>A</sub> au niveau des membranes plasmiques des cellules acinaires ainsi qu'au centre des îlot de Langerhans où sont retrouvées les cellules  $\beta$ . Lorsque comparée au contrôle préimmun (SPI), la présence du récepteur CCK<sub>A</sub> n'a pu être identifiée au niveau du pancréas exocrine de porc, tandis que les îlots de cet animal se distinguent de la masse acinaire par leur marquage diffus. Pour ce qui est du pancréas fœtal humain, la présence du récepteur CCK<sub>A</sub> n'a pu être identifiée et ce, autant au niveau des îlots qu'au niveau de la masse exocrine, lorsque comparée avec le contrôle préimmun (SPI).

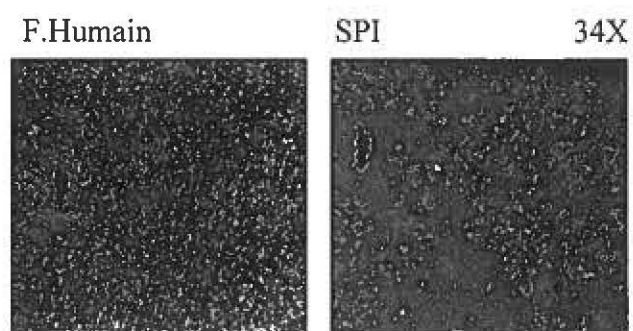
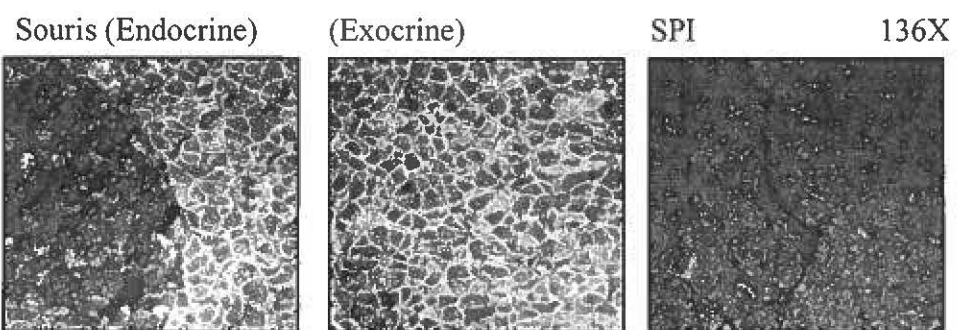
**Figure 6      Immunofluorescence indirecte du récepteur CCK<sub>A</sub> du pancréas de souris (A), de porc (B) et de fœtus humain (20 semaines) (C).**

Des cryosections de 4-5µm d'échantillons de chacune des espèces présentées ont été marquées à l'aide de l'anticorps CCK<sub>A</sub> #1122 utilisé à une dilution de 1 : 100 puis révélées à l'aide d'un anticorps secondaire jumelé à la fluorescéine. Un contrôle négatif pour chacune des réactions a été obtenu à l'aide d'un sérum préimmun (SPI).

Endocrine /Exocrine: tissu endocrine (îlot) vs. tissu exocrine (cellules acinaires).

(humain adulte, porc, souris, grossissement de l'objectif 40X)

(fœtal humain, grossissement de l'objectif 10X)



## **3.2 Expression du récepteur CCK<sub>B</sub>**

### **3.2.1 Ontogénie de l'expression du récepteur CCK<sub>B</sub> dans le pancréas de rat**

L'analyse par buvardage Northern du niveau d'expression de l'ARNm du récepteur CCK<sub>B</sub> a permis d'identifier un transcrit d'environ 2.7Kb, fortement exprimé au niveau du cerveau (Cerv) mais indétectable au niveau du pancréas (pour chacun des âges à l'étude) (Figure 7A).

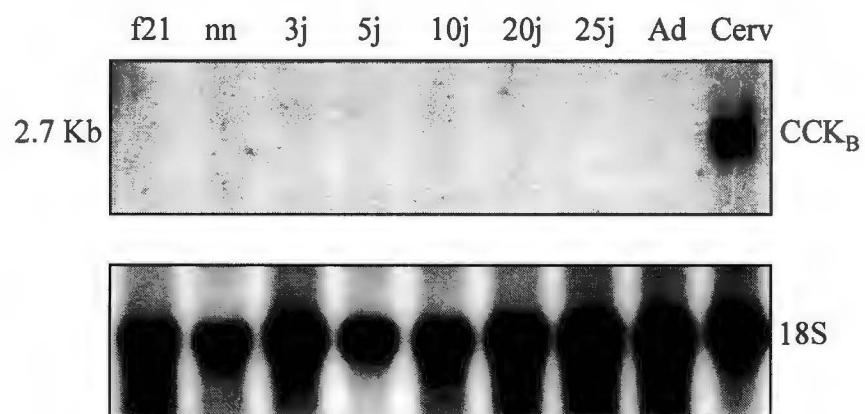
Ce n'est qu'à l'aide d'une méthode de détection beaucoup plus sensible, par RT-PCR que la présence du messenger du récepteur CCK<sub>B</sub> a pu être identifiée au niveau du pancréas. Contrairement à l'antré pylorique et au contrôle négatif interne de la réaction de PCR, il a été possible d'amplifier un fragment de 669pb correspondant à un segment de l'ADNc encodant pour le récepteur CCK<sub>B</sub>, amplifié à l'aide d'oligonucléotides spécifiques du récepteur CCK<sub>B</sub> de rat et ce, autant au niveau du pancréas de rat fœtal (f21) et adulte qu'au niveau du cerveau de rat adulte (Figure 7B).

**Figure 7      Analyse par Northern de l'expression du récepteur CCK<sub>B</sub> du pancréas de rat.**

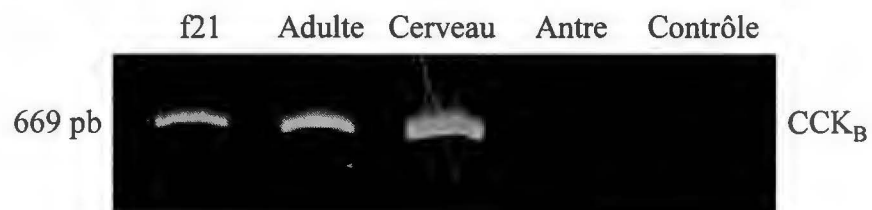
20µg d'ARN total de pancréas foetal (f21), postnataux (nn : nouveau né, 3, 5, 10, 20, 25 jours, Ad : Adulte) ainsi que de cerveau adulte (Cerv) de rat ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dénaturant et ont été hybridés à l'aide d'une sonde d'ARNc du récepteur CCK<sub>B</sub> marquée au <sup>32</sup>P. Une sonde d'ADNc de l'ARN ribosomal 18S a été utilisée dans le but d'évaluer la charge relative d'ARN transféré sur membrane (A). Un gel d'acrylamide de 4% coloré au bromure d'éthidium présente un segment de 669 pb de l'ADNc codant pour le récepteur CCK<sub>B</sub> amplifié par PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques à partir d'échantillons d'ARN total de pancréas foetal de 21 jours (f21), de pancréas adulte, de cerveau ainsi que d'antré pylorique de rat pour plus de 30 cycles d'amplification (B). Ces données sont représentatives de trois échantillons de tissus pancréatiques issus de trois animaux différents pour chacun des temps étudiés.

Contrôle : absence de matrice d'ADN dans la réaction d'amplification.

A



B



À l'aide d'un anticorps dirigé contre la portion N-terminale (42-55) du récepteur CCK<sub>B</sub> de chien, il a été possible d'identifier, par buvardage Western, l'ontogénie de l'expression de la protéine du récepteur CCK<sub>B</sub> de rat à partir de fractions membranaires pancréatiques brutes. Étonnamment, vue la rareté et /ou la très courte stabilité de ce messager dans le pancréas, une protéine d'environ 80kDa a pu être identifiée, celle-ci ne semblant pas être modulée au cours du développement pancréatique de rat (Figure 8A).

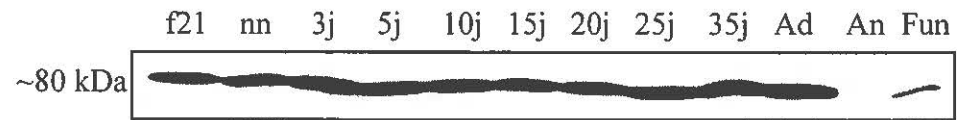
Telle qu'observée lors de l'amplification PCR, l'antré pylorique (An) demeure dépourvue de récepteur CCK<sub>B</sub> (Figure 7B vs Figure 8A), contrairement à la glande fundique (Fun) où ce dernier, tout comme dans le pancréas, est retrouvé avec un poids moléculaire d'environ 80kDa. Par préabsorption (+) de l'anticorps avec l'antigène peptidique correspondant (Figure 8B), la spécificité de ces bandes a pu être confirmée. De plus, sa localisation au niveau des cellules pariétales qui se distinguent de par leur volume, leur noyau basal ainsi que par leur morphologie triangulaire, ainsi qu'au niveau des cellules  $\delta$  (delta) à somatostatine dans la glande fundique (Figure 8C) est en accord avec son implication dans le contrôle de la sécrétion d'acide gastrique et de somatostatine chez différentes espèces. C'est avec beaucoup de surprise que la présence du récepteur CCK<sub>B</sub> a été identifiée, par immunofluorescence indirecte au niveau de certaines cellules du pancréas endocrine et ce, à chacun des temps étudiés (Figure 9).



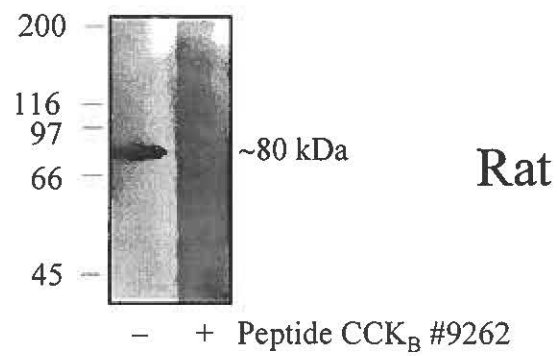
**Figure 8      Analyse par Western de l'expression du récepteur CCK<sub>B</sub> du pancréas de rat (A et B) et localisation dans la glande gastrique (C).**

30µg de protéines (fractions membranaires brutes) de pancréas fœtal (f21), postnataux (nn : nouveau né, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 35 jours, Ad : Adulte), d'antrum pylorique (An) et de fundus gastrique (Fun) de rat ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide SDS-PAGE 10% et révélées à l'aide de l'anticorps CCK<sub>B</sub> #9262 utilisé à une dilution de 1 : 10 000 (A). À nouveau, 30µg de protéines membranaires de pancréas de rat adulte avant (-) ou après (+) une immunoneutralisation réalisée par préincubation de l'anticorps CCK<sub>B</sub> #9262 1h avec 10µg · ml<sup>-1</sup> d'antigène peptidique correspondant (B). Ces données sont représentatives de trois échantillons de tissus pancréatiques issus de trois animaux différents pour chacun des temps étudiés. Des coupes sériées de glande fundique de rats adultes de 4-5µm ont été marquées à l'aide des anticorps CCK<sub>B</sub> #9262 (1 : 500) et somatostatine (1 : 2000) puis révélées à l'aide d'un anticorps secondaire jumelé à la fluorescéine (C). Un contrôle négatif de la réaction a été obtenu à l'aide d'un sérum préimmun (SPI). (grossissement de l'objectif 40X)

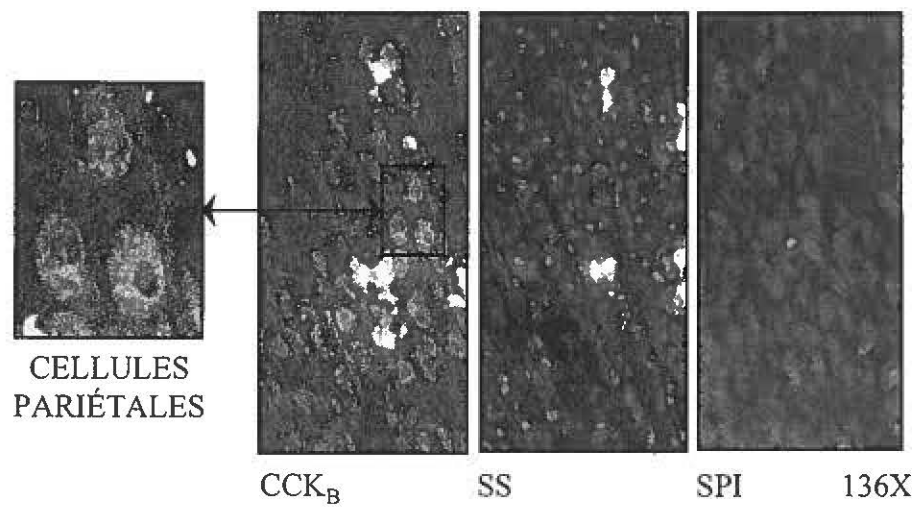
A



B



C

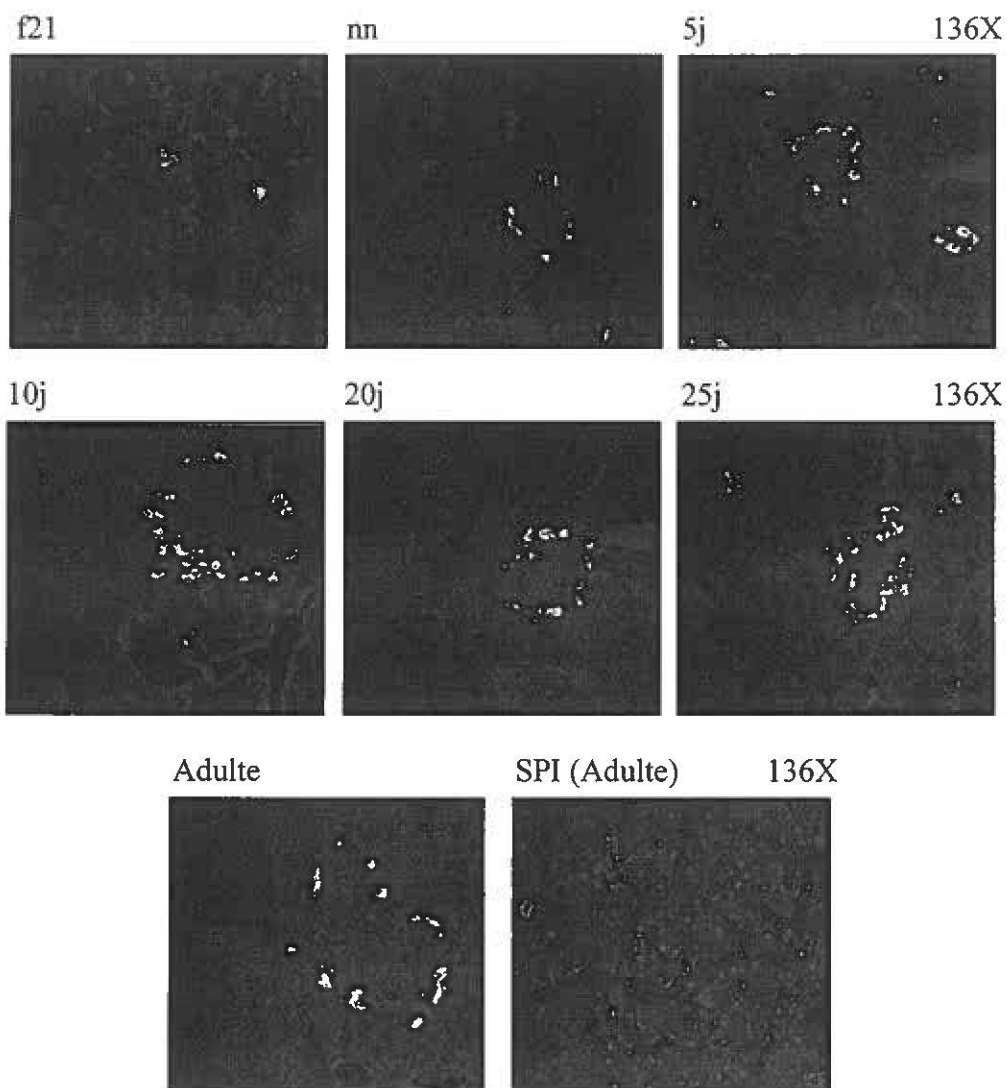


**Figure 9      Immunofluorescence indirecte du récepteur CCK<sub>B</sub> au cours du développement pancréatique de rat.**

Des cryosections de 4-5µm ont été marquées à l'aide de l'anticorps CCK<sub>B</sub> #9262 utilisé à une dilution de 1 : 500, puis révélées à l'aide d'un anticorps secondaire jumelé à la fluorescéine. Un contrôle négatif de la réaction a été obtenu à l'aide d'un sérum préimmun (SPI).

f21 : pancréas fœtal de 21 jours; nn : pancréas de nouveau né;  
5j, 10j, 20j, 25j, Adulte, âge des animaux après la naissance.

(magnitude 136X)



L'intensité du marquage variant très peu d'un âge à l'autre, ces résultats sont en accord avec ceux déjà obtenus par buvardage Western à l'aide du même anticorps (CCK<sub>B</sub> #9262 ; 42-55). La spécificité de ce marquage a été confirmée par l'utilisation d'un sérum préimmun (SPI) à titre de contrôle négatif de la réaction. Quoique le marquage de cet anticorps en immunofluorescence semble d'avantage cytosolique que membranaire, il a été possible de constater, par buvardage Western (résultats non-présentés), un très fort enrichissement du récepteur dans les fractions membranaires par rapport aux fractions cytosoliques pancréatiques.

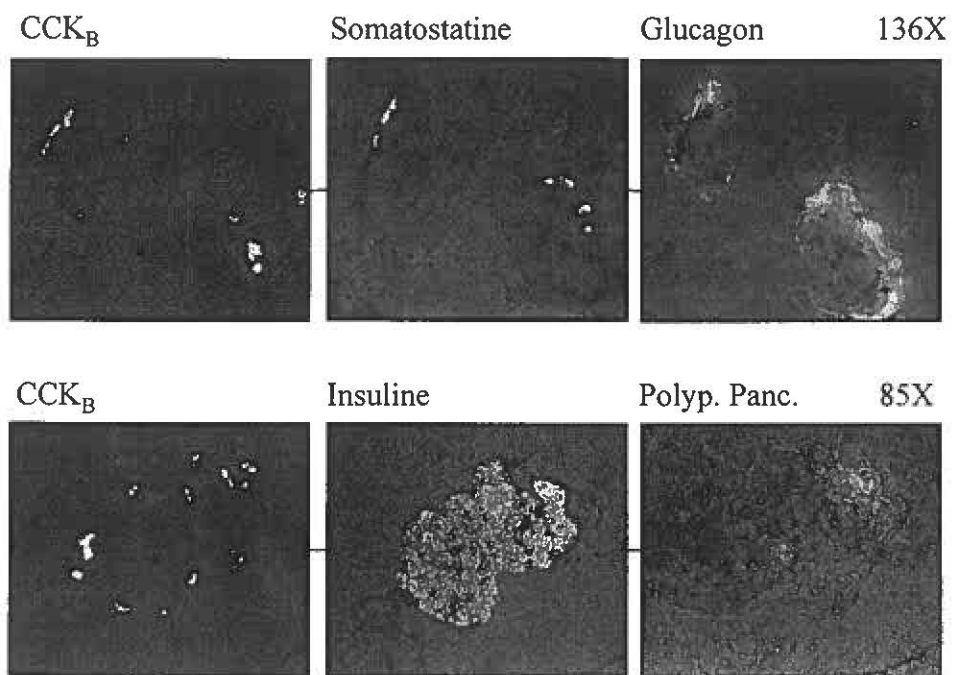
Dans le but d'identifier le type de cellules endocrines pouvant exprimer à leur surface le récepteur CCK<sub>B</sub>, des coupes sériées de 4 à 5µm (par groupe de trois) ont été marquées à l'aide des différents anticorps dirigés contre des protéines types du pancréas endocrine. Tel que présenté à la Figure 10, les cellules δ (delta) à somatostatine, localisées au pourtour des îlots de Langerhans ont été identifiées comme présentant un patron d'expression très semblable à celui obtenu par un marquage à l'aide de l'anticorps CCK<sub>B</sub> #9262, contrairement à ceux obtenus à l'aide des anticorps conçus pour interagir contre le glucagon, l'insuline et le polypeptide pancréatique.

**Figure 10 Colocalisation par immunofluorescence indirecte du récepteur CCK<sub>B</sub> pancréatique de rat avec différents marqueurs du pancréas endocrine.**

Des coupes sériées de pancréas de rats adultes de 4-5µm (par groupe de trois) ont été marquées à l'aide des anticorps suivants : CCK<sub>B</sub> #9262 (1 : 500); somatostatine (1 : 2000); glucagon (1 : 50); insuline (1 : 50) et polypeptide pancréatique (1 : 2000) puis révélées à l'aide d'un anticorps secondaire jumelé à la fluorescéine.

(coupes du haut, grossissement de l'objectif 40X)

(coupes du bas, grossissement de l'objectif 25X)



Pancréas de Rat

### **3.2.2 Expression du récepteur CCK<sub>B</sub> dans le pancréas fœtal et adulte humain, de porc et de souris**

Dans le but de vérifier la présence du récepteur CCK<sub>B</sub> chez différentes espèces mise à part le rat, des analyses par buvardage Western ont été réalisées et celles-ci ont permis d'identifier, à l'aide du même anticorps utilisé précédemment chez le rat (CCK<sub>B</sub> #9262 ; 42-55), une protéine d'environ 80kDa ainsi qu'une autre protéine d'environ 50kDa au niveau de fractions membranaires pancréatiques brutes de souris (Figure 11A). Par préabsorption (+) de l'anticorps avec l'antigène peptidique correspondant, la spécificité de ces bandes a été confirmée. Par contre, au niveau du pancréas de porc, seule une bande d'environ 50kDa a été reconnue par l'anticorps CCK<sub>B</sub> #9252 de façon spécifique (Figure 11B), tandis qu'au niveau du pancréas fœtal humain, une protéine d'environ 115kDa a pu être identifiée à l'aide de l'anticorps CCK<sub>B</sub> #9413 (Figure 11C).

À nouveau, la spécificité de cette bande a été vérifiée par préincubation (+) de l'anticorps primaire avec l'antigène correspondant. À l'inverse du récepteur CCK<sub>A</sub>, la distribution du récepteur CCK<sub>B</sub> entre ces différentes espèces semble être très similaire ; une localisation endocrine tout comme dans le pancréas de rat, quoique le marquage observé au niveau du pancréas fœtal humain soit aussi présent au centre des îlots de Langerhans (Figure 11C).

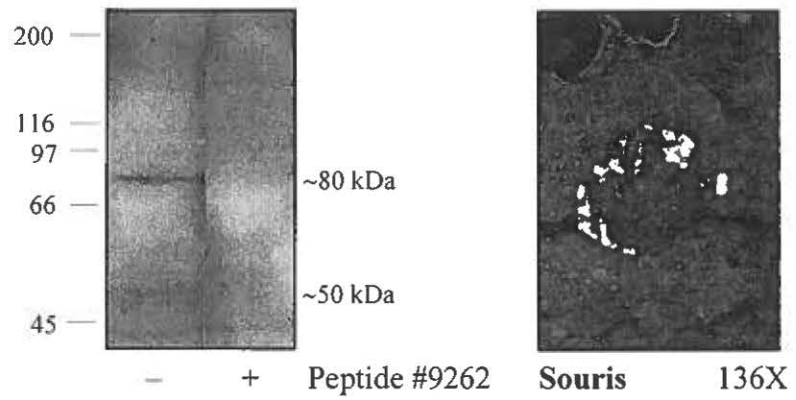


**Figure 11      Analyse par Western et immunofluorescence du récepteur CCK<sub>B</sub> pancréatique de souris (A), de porc (B) et de fœtus humain (20 semaines) (C).**

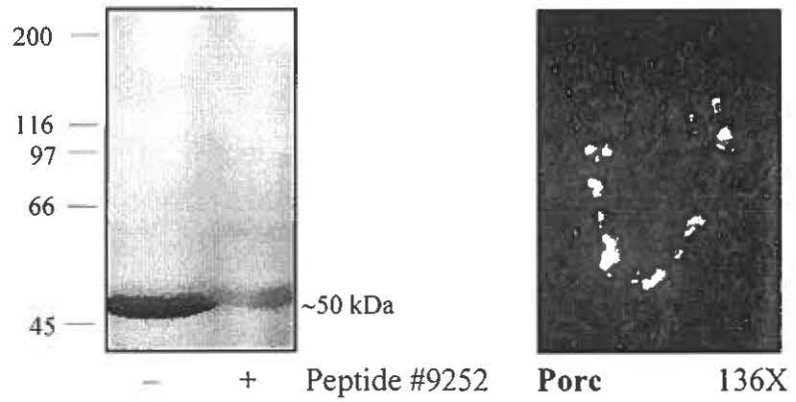
Les anticorps polyclonaux CCK<sub>B</sub> #9262 (1 : 10 000), CCK<sub>B</sub> #9252 (1 : 5000) et CCK<sub>B</sub> #9413 (1 : 5000) ont respectivement été utilisés pour révéler 30µg de protéines membranaires de pancréas de souris (A), de porc (B) et de fœtus humain (C). séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide SDS-PAGE 10% avant (-) ou après (+) une immunoneutralisation réalisée par préincubation de l'anticorps primaire 1h avec 10µg · ml<sup>-1</sup> d'antigène peptidique correspondant. Ces données sont représentatives de trois échantillons de tissus pancréatiques issus de trois animaux différents. À droite, des cryosections de 4-5µm de pancréas de chacune des espèces présentées ont été marquées à l'aide de l'anticorps CCK<sub>B</sub> #9262 utilisé à une dilution de 1 : 500, puis révélées par l'utilisation d'un anticorps secondaire jumelé à la fluorescéine.

(magnitude 136X)

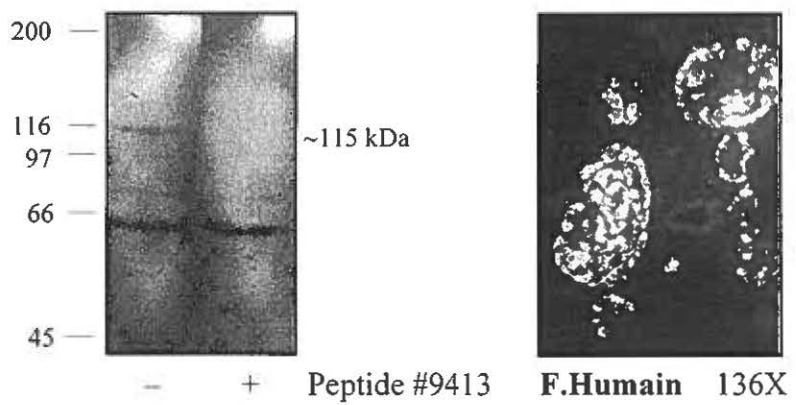
A



B



C



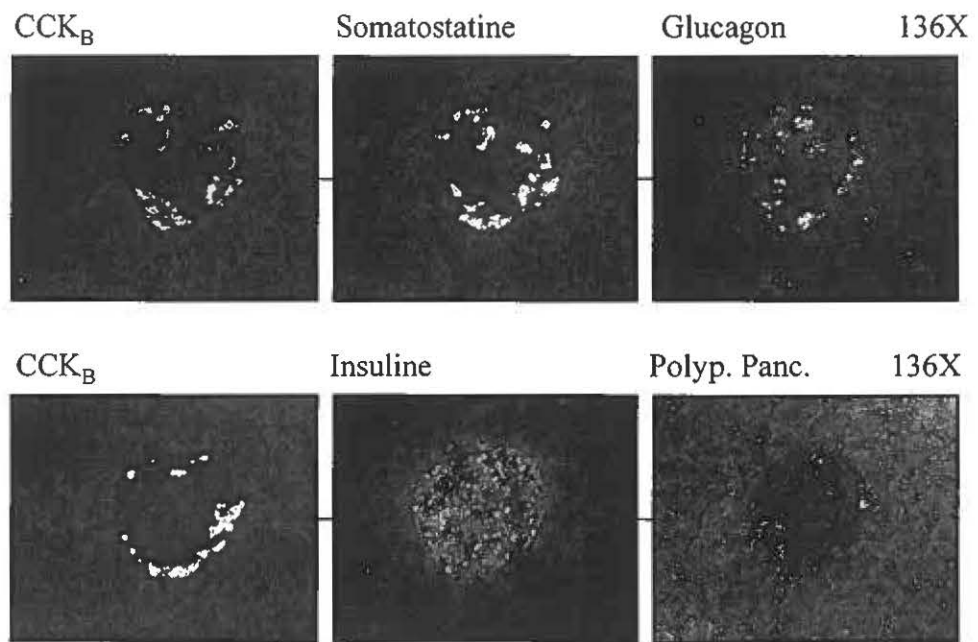
En vue de colocaliser la présence du récepteur CCK<sub>B</sub> avec différents marqueurs du pancréas endocrine chez ces différentes espèces, des coupes sériées de 4 à 5µm (par groupe de trois) ont à nouveau été utilisées. Telles que présentées aux Figures 12, 13, et 14 les cellules δ (delta) à somatostatine, localisées majoritairement au niveau du pourtour des îlots de Langerhans du pancréas de la souris (Figure 12), du porc (Figure 13) et du pancréas fœtal humain (Figure 14) présentent un patron d'expression identique (à quelques mm près) à celui obtenu avec l'anticorps CCK<sub>B</sub> #9262, alors que les patrons d'expression des autres marqueurs endocrines ne correspondent pas à ce dernier. Donc, quatre espèces différentes expriment toutes le récepteur CCK<sub>B</sub> au niveau du pancréas endocrine, à la surface des cellules δ .

**Figure 12 Colocalisation par immunofluorescence indirecte du récepteur CCK<sub>B</sub> pancréatique de souris avec différents marqueurs du pancréas endocrine.**

Des coupes sériées de pancréas de souris adultes de 4-5µm (par groupe de trois) ont été marquées à l'aide des anticorps suivants : CCK<sub>B</sub> #9262 (1 : 500); somatostatine (1 : 2000); glucagon (1 : 50); insuline (1 : 50) et polypeptide pancréatique (1 : 2000) puis révélées à l'aide d'un anticorps secondaire jumelé à la fluorescéine.

(coupes du haut, grossissement de l'objectif 40X)

(coupes du bas, grossissement de l'objectif 40X)



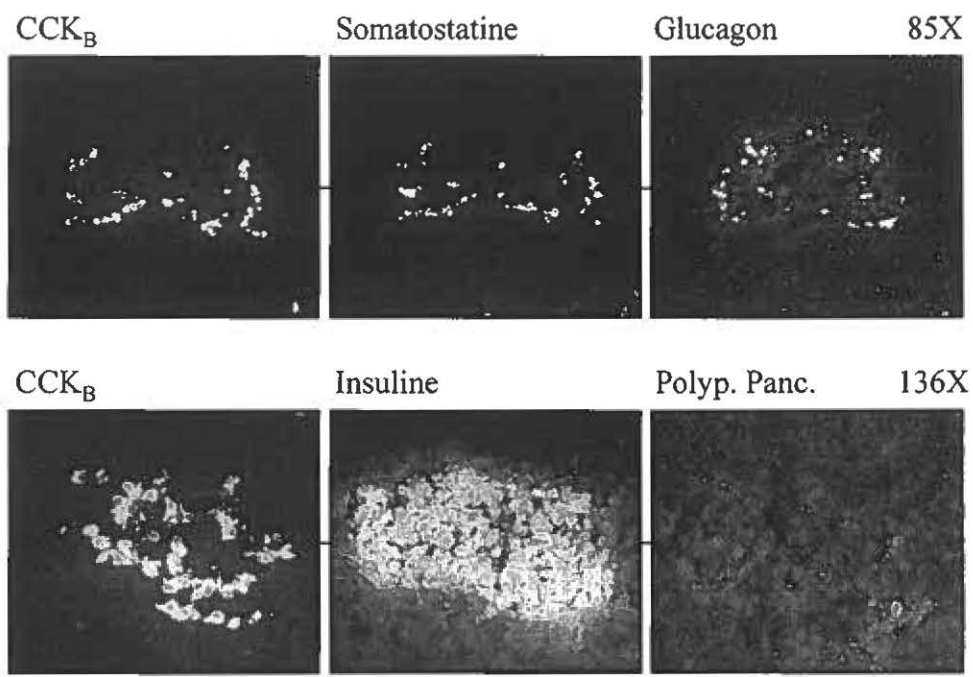
Pancréas de Souris

**Figure 13 Colocalisation par immunofluorescence indirecte du récepteur CCK<sub>B</sub> pancréatique de porc avec différents marqueurs du pancréas endocrine.**

Des coupes sériées de pancréas de porcs adultes de 4-5µm (par groupe de trois) ont été marquées à l'aide des anticorps suivants : CCK<sub>B</sub> #9262 (1 : 500); somatostatine (1 : 2000); glucagon (1 : 50); insuline (1 : 50) et polypeptide pancréatique (1 : 2000) puis révélées à l'aide d'un anticorps secondaire jumelé à la fluorescéine.

(coupes du haut, grossissement de l'objectif 25X)

(coupes du bas, grossissement de l'objectif 40X)



Pancréas de Porc

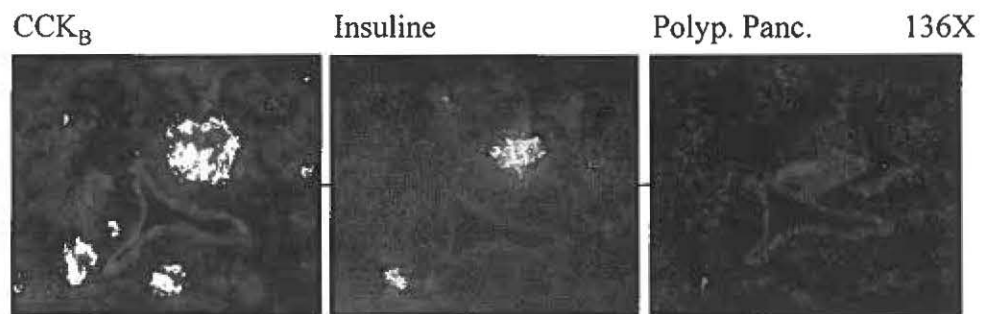
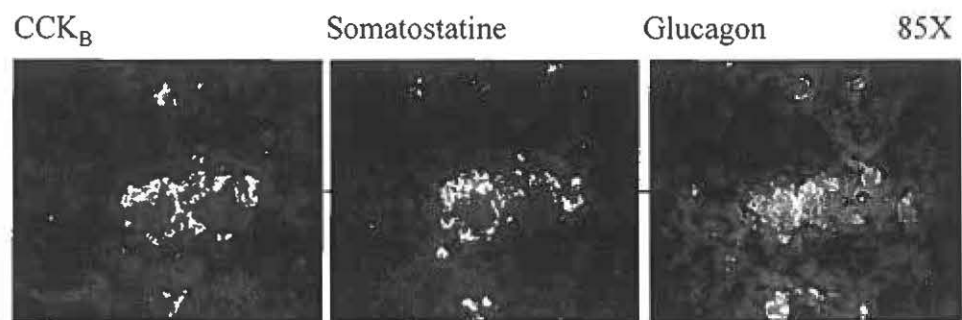
**Figure 14 Colocalisation par immunofluorescence indirecte du récepteur CCK<sub>B</sub> pancréatique fœtal humain (20 semaines) avec différents marqueurs du pancréas endocrine.**

Des coupes sériées de pancréas fœtal humain de 4-5µm (par groupe de trois) ont été marquées à l'aide des anticorps suivants : CCK<sub>B</sub> #9262 (1 : 500); somatostatine (1 : 2000); glucagon (1 : 50); insuline (1 : 50) et polypeptide pancréatique (1 : 2000) puis révélées à l'aide d'un anticorps secondaire jumelé à la fluorescéine.

(coupes du bas, grossissement de l'objectif 40X)

(coupes du haut, grossissement de l'objectif 25X)





Pancréas Foetal Humain

### **3.3 Expression de la gastrine pancréatique**

#### **3.3.1 Ontogénie de l'expression de la gastrine pancréatique de rat**

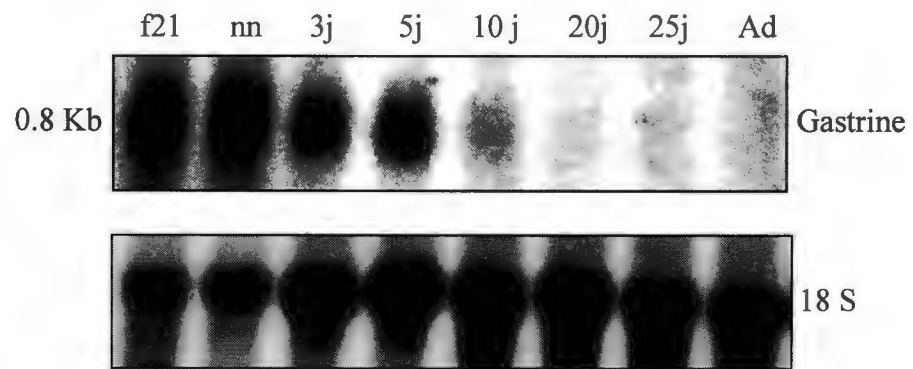
L'analyse par buvardage Northern du niveau d'expression de l'ARNm de la gastrine pancréatique de rat a permis d'identifier un transcrit d'environ 0.8Kb (Figure 15A) très fortement exprimé au niveau du pancréas fœtal (f21) et du pancréas du nouveau-né (nn), ces niveaux d'expression chutent ensuite pour atteindre des valeurs quasi indétectables dès l'âge de 10 jours et demeurent ainsi jusqu'à l'âge adulte (Figure 15B).

C'est à l'aide de l'anticorps #8007 dirigé contre la gastrine de rat qu'il a d'abord été possible d'identifier la gastrine au niveau de la base des glandes de l'antré pylorique (Figure 16A), où sont situées les cellules G synthétisant cette hormone. Par la suite, la gastrine a pu être localisée au niveau de certaines cellules du pancréas endocrine (Figure 16B), déjà décrites comme étant les cellules  $\delta$  (delta) à somatostatine (ERLANDSEN et al., 1976). Ces résultats suggèrent fortement que l'expression de la protéine du récepteur CCK<sub>B</sub> n'est pas sous le contrôle direct de la gastrine pancréatique du moins après le 10<sup>ième</sup> jour suivant la naissance

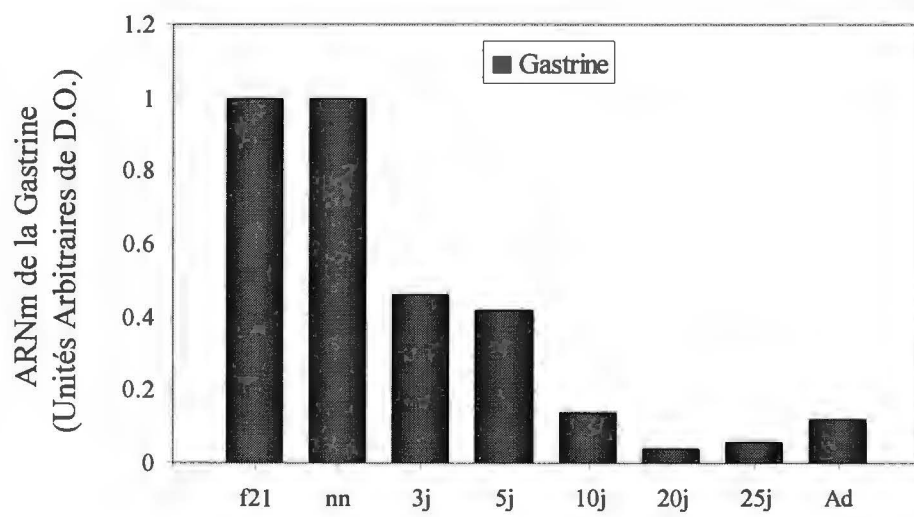
**Figure 15      Analyse par Northern de l'expression de la gastrine pancréatique de rat.**

20µg d'ARN total de pancréas fœtal (f21) et postnataux (nn : nouveau né, 3, 5, 10, 20, 25 jours, Ad : Adulte) de rat ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dénaturant et ont été hybridés à l'aide d'une sonde d'ARNc de la gastrine marquée au <sup>32</sup>P. Une sonde d'ADNc de l'ARN ribosomal 18S a été utilisée dans le but d'évaluer la charge relative d'ARN transféré sur membrane (A). Un histogramme de l'abondance relative du messenger d'environ 0.8 Kb de la gastrine à différents temps au cours du développement a été obtenu par photodensitométrie du transcrit. Chacune des valeurs obtenues a été normalisée selon l'abondance de l'ARN 18S correspondant (B). Les données présentées en (A) sont représentatives de trois échantillons de tissus pancréatiques issus de trois animaux différents pour chacun des temps étudiés.

A



B



**Figure 16      Immunofluorescence indirecte de la gastrine de l'antré pylorique et du pancréas de rat.**

Des cryosections de 4-5µm d'antré pylorique (A), de pancréas fœtal (f21) et postnataux (nn : nouveau né, 5 et 10 jours, Ad : Adulte) de rat (B), ont été marquées à l'aide de l'anticorps #8007 de la gastrine utilisé à une dilution de 1 : 100 puis révélées à l'aide d'un anticorps secondaire jumelé à la fluorescéine.

(antré pylorique, grossissement de l'objectif 25X)

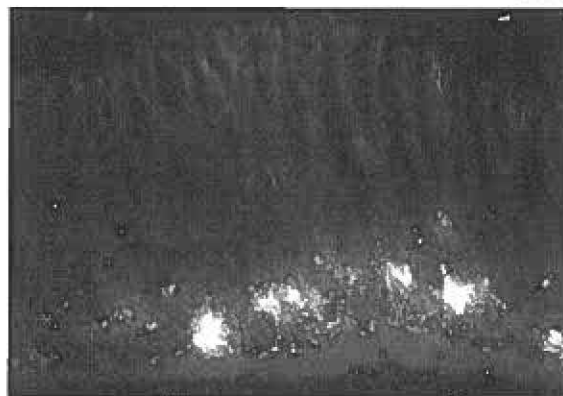
(coupes de pancréas du haut, grossissement de l'objectif 100X)

(coupes de pancréas du bas, grossissement de l'objectif 40X)

A

Antre pylorique

85X



B

f21

nn

5j

340X



10j

Adulte

136X



## **CHAPITRE IV**

### **DISCUSSION**

Les expériences présentées dans ce mémoire visaient à caractériser l'ontogénèse de l'expression des récepteurs de la cholécystokinine au cours du développement pancréatique chez le rat ainsi que chez diverses espèces en vue de mieux comprendre l'implication de la cholécystokinine et de la gastrine dans le maintien des fonctions pancréatiques.

#### **LE RÉCEPTEUR CCK<sub>A</sub>**

Depuis les premiers rapports faisant allusion à la séquence nucléotidique encodant pour le récepteur CCK<sub>A</sub> (WANK et al., 1992a), l'analyse du messenger de ce récepteur au niveau du pancréas de rat a fait l'objet de plusieurs études (ZHOU et al., 1993; MONSTEIN et al., 1996; MIYASAKA et al., 1995). Toutefois, seule une d'entre elles a démontré une modulation à la hausse dans le patron d'expression du récepteur CCK<sub>A</sub> au cours du développement pancréatique chez le rat (MIYASAKA et al., 1995). Nos résultats confirment cette augmentation d'expression de l'ARNm du récepteur CCK<sub>A</sub> avec l'âge chez le rat, spécialement au cours des premiers jours de vie de l'animal où nous observons un enrichissement du messenger (Figure 2).

Certaines études de liaison ont également permis de mettre en évidence cette maturation du récepteur à cholécystokinine (LEUNG et al., 1986; HADJIIVANOVA et al., 1992). Nos résultats nous ont de plus permis d'établir une certaine corrélation entre les niveaux d'expression du récepteur CCK<sub>A</sub> (Figure 2) et le patron d'expression de la cholécystokinine intestinale chez le rat (BOURASSA et al., 1999). Tous deux présentent une première hausse d'expression environ 5 jours après la naissance correspondant au début de la période de lactation chez les rats nouveau-nés. Ils atteignent ensuite un niveau maximal d'expression aux abords du sevrage (~21 jours) pour ensuite se stabiliser à un niveau moindre et ce, jusqu'à l'âge adulte.

La caractérisation biochimique du récepteur CCK<sub>A</sub> effectuée par liaisons covalentes de peptides iodés (BALDWIN, 1993) a permis d'identifier, par analyse SDS-PAGE, une bande diffuse de 85-95 kDa ainsi qu'une bande de 42 kDa correspondant au cœur de la protéine (PEARSON et MILLER, 1987). L'utilisation d'un anticorps spécifique au récepteur CCK<sub>A</sub> pancréatique de rat nous a permis de mettre en évidence deux protéines de faible poids moléculaire de ~40 et ~50 kDa (Figure 3). Ces protéines correspondent d'avantage à une forme non-glycosylée du récepteur ou encore à une forme tronquée du récepteur CCK<sub>A</sub> pancréatique de rat de ~47-50 kDa décrite récemment par l'équipe de SILVENTE POIROTT et al., (1994) par photo-affinité.



Il demeure néanmoins difficile de définir avec exactitude le poids moléculaire de ce récepteur puisque aucune des méthodes utilisées jusqu'ici pour l'identifier n'a confirmé les résultats obtenus par l'utilisation d'un anticorps. La bande diffuse de 85-95 kDa visualisée précédemment sous conditions natives par liaison de CCK iodée correspond probablement à un dimère de récepteurs CCK<sub>A</sub> difficilement identifiable sous conditions dénaturantes et réduites ( $\beta$ -mercaptoéthanol). Nous croyons cependant que le poids moléculaire du récepteur CCK<sub>A</sub> estimé à environ ~40 et ~50 kDa est exact puisque la spécificité de ces bandes a été confirmée par disparition de celles-ci par préabsorption avec l'antigène peptidique correspondant.

L'augmentation graduelle de l'intensité de marquage de la protéine du récepteur CCK<sub>A</sub> observée par immunofluorescence (Figure 4) corrèle avec nos résultats obtenus par buvardage Western (Figure 3). La localisation du récepteur CCK<sub>A</sub> à la membrane plasmique des acini pancréatiques corrobore son rôle important dans la sécrétion et la croissance pancréatiques et valide la qualité et la spécificité de notre anticorps. De plus, l'identification du récepteur CCK<sub>A</sub> au niveau des cellules  $\beta$  (bêta) des îlots de Langerhans supporte certains résultats ayant permis sa détection par RT-PCR à partir d'îlots intacts isolés (FUNAKOSHI et al., 1996a; MONSTEIN et al., 1996) ou encore par autoradiographie (SAKAMOTO et al., 1985) et vient confirmer le rôle de la CCK comme stimulant de la sécrétion d'insuline (FUNAKOSHI et al., 1996a; VERSPOHL et al., 1994).

La présence de la protéine du récepteur CCK<sub>A</sub> au niveau de la membrane plasmique des acini pancréatiques de souris (Figure 6) vient confirmer certains travaux ayant permis la caractérisation de ce récepteur au niveau d'acini isolés de pancréas de souris (SANKARAN et al., 1980). Toutefois, l'utilisation d'un anticorps spécifique a permis pour la première fois de démontrer la présence de ce récepteur au niveau des cellules  $\beta$  (béta) des îlots de Langerhans de souris tel que démontré chez le rat.

Cependant, la distribution du récepteur CCK<sub>A</sub> pancréatique chez le porc diffère de celle observée chez les rongeurs utilisés lors de cette étude. Sa présence n'a pu être identifiée au niveau du pancréas exocrine, alors que les îlots du pancréas de porc se distinguent de la masse acinaire par leur marquage diffus (Figure 6). Ces résultats supportent le fait que 1) l'ARNm du récepteur CCK<sub>A</sub> est beaucoup moins abondant que celui du récepteur CCK<sub>B</sub> chez cette espèce, 2) les acini pancréatiques de porc fraîchement isolés ont très peu d'affinité pour la caéruléine et ne répondent pas au JMV-180, un agoniste du récepteur CCK<sub>A</sub> de haute affinité, et finalement, 3) en réponse à de fortes concentrations de caéruléine, la sécrétion d'amylase n'est pas inhibée par le MK-329, un antagoniste spécifique du récepteur CCK<sub>A</sub> (MORISSET et al., 1996). Donc chez le porc, l'occupation du récepteur CCK<sub>A</sub> serait plutôt associée à la relâche d'insuline qu'à la sécrétion des enzymes digestifs.

Pour ce qui est du pancréas foetal humain, la présence du récepteur CCK<sub>A</sub> n'a pu être identifiée et ce, autant au niveau des îlots de Langerhans qu'au niveau des acini (Figure 6) malgré le fait que l'analyse Western ait démontré, de façon spécifique la présence d'une bande correspondant à une protéine d'environ 45 kDa chez ce dernier (Figure 5). Mais comme l'accès aux biopsies de pancréas normal est limité chez l'humain adulte, nous n'avons pas pu effectuer d'étude d'immunofluorescence indirecte sur celles-ci. Il demeure donc difficile voir impossible, en se basant uniquement sur les résultats obtenus à l'aide d'échantillons foetaux humains, de tirer quelconque conclusions concernant la présence et la localisation du récepteur CCK<sub>A</sub> chez cette espèce.

La présence du récepteur CCK<sub>A</sub>, en moins grande quantité que le récepteur CCK<sub>B</sub> a déjà été observée dans le pancréas humain adulte par RT-PCR (MONSTEIN et al., 1996) et son expression ne semble pas être modulée entre la jeune enfance et l'âge adulte (NISHIMORI et al., 1999). Donc, cette absence de marquage du récepteur CCK<sub>A</sub> sur les coupes de pancréas foetal humain pourrait être due à un défaut de reconnaissance inter-espèce antigène-anticorps en immunofluorescence puisque l'anticorps utilisé ici a été produit contre le récepteur CCK<sub>A</sub> de rat.

## LE RÉCEPTEUR CCK<sub>B</sub>

Au cours de la période foetale et périnatale du développement pancréatique chez le rat et l'humain, la gastrine, agoniste spécifique du récepteur CCK<sub>B</sub> reconnue comme stimulant de la sécrétion acide et de la croissance de la muqueuse gastrique chez le hamster, le cochon d'Inde, le poulet et le rat (HAKANSON et al., 1988; WALSH, 1994) est exprimée de façon importante dans les cellules  $\delta$  (delta) du pancréas (Figure 15).

Nos résultats confirment ceux de ERLANDSEN et al., (1976) et de BARDRAM et al., (1990) ayant permis de localiser, par immunohistochimie sur coupes sériées, la présence de somatostatine et de gastrine au sein de la même population de cellules. Le rôle de la gastrine à ce stade du développement chez le rat semble associé à la différenciation et à la maturation du pancréas puisque l'administration d'un analogue de la gastrine, la pentagastrine, au cours de la gestation chez le rat (femelle gestante en état d'hyperphagie) affecte considérablement la croissance du pancréas foetal causant une hypertrophie de la glande (MORISSET et al., 1999). De plus, un traitement au L-365,260, un antagoniste spécifique du récepteur CCK<sub>B</sub>, a retardé le développement de l'organe causant ainsi l'aplasie du tissu pancréatique foetal (MORISSET et al., 1999).

Toutefois, l'étude de Ballinger et al., (1997) réalisée chez des fœtus de rats de 18 jours ne permet pas d'associer l'occupation du récepteur CCK<sub>B</sub> à la croissance pancréatique ni à la sécrétion d'enzymes digestifs à ce stade du développement.

Donc, qu'en est-il du rôle de la gastrine pancréatique dans le contrôle de la croissance du pancréas fœtal et postnatal via l'occupation du récepteur CCK<sub>B</sub> puisque dès le 10<sup>ième</sup> jour après la naissance, son expression chute pour atteindre des niveaux quasi indécélables alors que sur le pancréas adulte de rat, l'administration de gastrine n'a pas d'effet trophique (MORISSET et al., 1999). Lorsque administrée de façon chronique à des doses atteignant le mg/kg, donc fortement supérieures aux concentration sériques atteintes suite à la prise d'un repas, sous ces conditions, la gastrine entraîne l'hyperplasie et l'hypertrophie pancréatiques chez le rat adulte (MAJUMDAR et GOLTERMANN, 1979). De plus, il paraît invraisemblable que la gastrine sérique issue de l'antrum pylorique en réponse à un repas (40pg/ml) chez le rat adulte puisse, une fois diluée dans le sang, stimuler la croissance du pancréas qui répond à des concentrations de l'ordre de la centaine de pM (ICHIKAWA et al., 1998). Pour qu'elle puisse avoir un effet, si effet il y a, la gastrine doit être produite localement dans le pancréas où elle pourrait atteindre de telles concentrations et agir de façon paracrine.

Donc la présence du récepteur CCK<sub>B</sub> au niveau du pancréas de rat pourrait être suspectée du moins au cours de la période fœtale et périnatale du développement pancréatique vue la production locale de gastrine à cette période du développement.

L'analyse Northern de l'ARNm du récepteur CCK<sub>B</sub> réalisée à partir d'échantillons d'ARN total de tissus pancréatiques n'a pas permis d'identifier de transcrit chez le rat (Figure 7) confirmant ainsi la difficulté de sa mise en évidence par certaines équipes par le biais de cette méthode (FUNAKOSHI et al., 1996b; MONSTEIN et al., 1996; ZHOU et al., 1995). Pourtant, sa présence au niveau du pancréas est encore aujourd'hui l'objet de controverses ; est-il exprimé par cet organe, et l'est-il suffisamment pour être traduit ? Par amplification PCR de l'ADNc 'reverse transcribed' d'ARN total du tissu pancréatique, nous avons pu déceler la présence du récepteur CCK<sub>B</sub> et ce, autant à partir d'échantillons de pancréas fœtal que ceux de pancréas adulte. Donc, l'ARNm du récepteur CCK<sub>B</sub> est présent dans le pancréas du rat ; il est retrouvé en très faibles concentrations et / ou sa stabilité est très réduite. De plus, le fait que le 'turn over' de cet ARNm puisse être très rapide ou encore sa demi-vie très courte sont d'autres avenues envisageables.

Cette difficulté à mettre en évidence la présence du récepteur CCK<sub>B</sub> au niveau du pancréas de rat soit par analyse Northern, par photo-affinité et même par RT-PCR a déjà été rapportée par différentes équipes (HADJIIVANOVA et al., 1992; ZHOU et al., 1995) et vient probablement du fait que l'étude de messagers faiblement exprimés requiert une attention particulière lors de l'extraction d'ARN vue la haute teneur en ARNase présente dans ce tissu.

La caractérisation biochimique du récepteur CCK<sub>B</sub> effectuée par liaison covalente de gastrine iodée sur une préparation de cellules pariétales partiellement purifiées d'estomac de chien a permis d'identifier une bande diffuse de poids moléculaire d'environ 74 kDa (MATSUMOTO et al., 1987). Depuis, l'utilisation d'anticorps spécifiques a permis de confirmer ce résultat par identification d'une bande d'environ 60 kDa grâce à l'analyse SDS-PAGE d'une préparation membranaire de cellules pariétales de chien (HELANDER et al., 1997).

Vu la rareté du messenger encodant pour le récepteur CCK<sub>B</sub> dans le pancréas de rat, il nous paraissait peu probable de pouvoir identifier un produit traduit de cet ARNm. Pourtant, une bande spécifique, déplacée par préabsorption de l'anticorps avec l'antigène peptidique correspondant, d'environ 80kDa a pu être identifiée (Figure 8). La protéine ne semble pas être modulée au cours du développement pancréatique chez le rat.

Par ailleurs, l'analyse Western de fractions membranaires de pancréas de souris a aussi permis de mettre en évidence, de façon spécifique, une protéine d'environ 80kDa ainsi qu'une autre protéine d'environ 50kDa (Figure 11A). Pour la toute première fois, nos résultats identifient la présence de la protéine du récepteur CCK<sub>B</sub> au niveau du pancréas du rat et de la souris. Toutefois, seule une protéine d'environ 50kDa a été reconnue de façon spécifique au niveau du pancréas de porc (Figure 11B). La présence de cette protéine de 50kDa a déjà été identifiée par photo-affinité de [<sup>125</sup>I]-ASA-[Thr, Nle]-CCK<sub>9</sub> sur une préparation membranaire de pancréas de porc et ce, de façon spécifique puisqu'elle est déplacée en présence du PD 135158, un antagoniste spécifique du récepteur CCK<sub>B</sub> (PHILIPPE et al., 1997). Finalement, au niveau du pancréas fœtal humain, une protéine d'environ 115kDa a pu être identifiée (Figure 11C). Ce poids moléculaire correspond exactement à celui du récepteur CCK<sub>B</sub> humain exprimé dans les cellules COS (SAILLAN-BARREAU et al., 1998).

Maintenant, dans le but de valider nos résultats sur la localisation endocrine du récepteur CCK<sub>B</sub> ainsi que sur la qualité et la spécificité de notre anticorps, nous avons procédé par immunofluorescence indirecte à l'analyse de la distribution de ce récepteur au niveau de la glande fundique. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence les cellules pariétales et  $\delta$  (delta) à somatostatine de cette portion de la glande gastrique de rat.



Ceci confirme certains résultats ayant permis d'identifier le récepteur CCK<sub>B</sub> par immunofluorescence (HELANDER et al., 1997), par RT-PCR *in situ* (KULAKSIZ et al., 2000) ou encore par autoradiographie (PRAISSMAN et al., 1998) au niveau de ces mêmes cellules.

Toutefois, certains travaux ont de plus observé la présence du récepteur CCK<sub>B</sub> au niveau des cellules ECL (KULAKSIZ et al., 2000; REUBI et al., 1997) ce que nous n'avons pu confirmer en immunofluorescence. Une fois de plus, ces résultats supportent l'implication respective de la gastrine et de la CCK dans le contrôle de la sécrétion d'acide chloridrique et de la sécrétion de la somatostatine tel que démontré chez le rat (AURANG et al., 1997), le chien (DELVALLE et al., 1993; HELANDER et al., 1997), le cochon d'Inde (HELANDER et al., 1997) ainsi que chez le mouton (ZAVROS ET SHULKES, 1997; ZAVROS et al., 1998) et confirme la spécificité de l'anticorps CCK<sub>B</sub> #9262 utilisé lors de nos expériences d'immunofluorescence. L'intensité du marquage de la protéine du récepteur CCK<sub>B</sub> observée par immunofluorescence au cours de l'ontogénie pancréatique chez le rat (Figure 9) corrèle avec nos résultats obtenus par buvardage Western (Figure 8). Sa distribution endocrine au niveau des cellules  $\delta$  (delta) à somatostatine dans le pancréas de rat, de souris, de porc et de fœtus humain nous a beaucoup étonnés.

En fait, cette découverte va à l'encontre de notre hypothèse initiale voulant que le récepteur CCK<sub>B</sub> soit exprimé dans le tissu exocrine au cours de la période fœtale et périnatale du développement pancréatique chez le rat à cause de la présence documentée de la gastrine fortement exprimée dans le pancréas à cette période du développement (BRAND et FULLER, 1988; MAJUMDAR, 1984; MORISSET et al., 2000). Toujours selon notre hypothèse initiale, la gastrine assurerait ainsi la croissance de l'organe via l'occupation du récepteur CCK<sub>B</sub>. Suivant cette période du développement, l'expression du récepteur CCK<sub>B</sub> disparaîtrait simultanément avec celle de la gastrine pour laisser place à l'expression de récepteur CCK<sub>A</sub>, dont l'activité serait régie par la CCK duodénale.

Mais finalement, le récepteur CCK<sub>B</sub> n'est pas localisé à la surface des acini pancréatiques mais bien au niveau des cellules endocrine  $\delta$  (delta) à somatostatine du pancréas chez le rat. Seul le récepteur CCK<sub>A</sub> est retrouvé à la surface des acini pancréatiques, bien qu'il le soit aussi au niveau des cellules  $\beta$  (bêta) à insuline. En fait, les fonctions biologiques médiées par l'occupation des récepteurs à la cholécystokinine semblent varier selon les espèces. Jusqu'ici, la prédominance du récepteur CCK<sub>B</sub> chez le pancréas de porc et humain semblait indiquer que ce récepteur pourrait être impliqué dans la sécrétion exocrine d'enzymes digestifs.

Mais puisque la sécrétion pancréatique en réponse à un repas et à l'administration exocrine de cholécystokinine chez le porc ne semble pas impliquer le récepteur  $CCK_A$  (LHOSTE et al., 1995; MORISSET et al., 1996) et que le récepteur  $CCK_B$  est uniquement retrouvé au niveau des cellules  $\delta$  du tissu pancréatique endocrine, ces observations suggèrent que les mécanismes responsables du contrôle de la sécrétion pancréatique chez le porc seraient plutôt d'origine neuveuse (HOLST et al., 1979).

Chez l'humain, la sécrétion pancréatique en réponse à un repas et à l'administration (exogène) de cholécystokinine semble être d'avantage sous le contrôle de mécanismes impliquant une coopération du récepteur  $CCK_A$  et la voie cholinergique (BEGLINGER et al., 1992; SOUDAH ET AL., 1992). Toutefois, la localisation du récepteur  $CCK_B$  au niveau des cellules endocrine  $\delta$  (delta) à somatostatine du pancréas chez l'humain va à l'encontre des résultats présentés par l'équipe de SAILLAN-BARREAU et al., (1999). Ce groupe de recherche a démontré que le récepteur  $CCK_B$  était majoritairement distribué au niveau des cellules  $\alpha$  (alpha) à glucagon du pancréas fœtal et adulte humain. La qualité des images présentées dans cette étude ne permet pas d'apprécier à sa juste valeur la colocalisation du récepteur  $CCK_B$  à d'autres marqueurs du pancréas endocrine.

Cette constatation, jumelée au fait que la réponse provoquée par la CCK et la gastrine sur la sécrétion de glucagon à partir d'une préparation d'îlots fraîchement isolés correspondent d'avantage à l'occupation du récepteur de type A (CCK ;  $EC_{50}$   $13 \pm 6$  pM, gastrine ;  $EC_{50}$   $8 \pm 5$  pM) complique l'interprétation des données obtenues lors de cette étude et ne permet pas de conclure que le récepteur CCK<sub>B</sub> 1) soit présent à la surface des cellules  $\alpha$  (alpha) à glucagon et 2) qu'il soit responsable de la sécrétion de glucagon chez l'homme.

De plus, par autoradiographie, la présence du récepteur CCK<sub>B</sub> sur du pancréas humain (TANG et al., 1996) et de souris transgéniques (SAILLAN-BARREAU et al., 1998) a déjà été identifiée et ce, de façon diffuse et homogène sur l'ensemble du tissu exocrine pancréatique contrairement à nos résultats. En fait, cette absence de marquage du tissu exocrine sur nos photos d'immunohistochimie n'exclue pas la présence du récepteur CCK<sub>B</sub> de la surface des cellules acinaires : la densité de ce récepteur à la surface de ces cellules pourrait simplement être trop faible pour en permettre la détection à l'aide de l'anticorps utilisé. Cette hypothèse demeure plausible puisque l'intensité de marquage des cellules  $\delta$  (delta) de la glande fundique de rat est de beaucoup supérieure à celle des cellules pariétales (MORISSET et al., 2000). Aussi, à l'aide du même anticorps (CCKB #9262), HELANDER et al., (1997) ne sont pas arrivés à mettre en évidence la présence du récepteur CCK<sub>B</sub> au niveau des cellules pariétales.

Enfin, nous croyons que la distribution du récepteur CCK<sub>B</sub> au niveau des cellules  $\delta$  (delta) à somatostatine, démontrée par simple colocalisation en coupes sériées de 4  $\mu$ m est juste. Toutefois, des études de double marquage du récepteur CCK<sub>B</sub> de concert avec la somatostatine et / ou le glucagon seront nécessaires afin de confirmer ces résultats et de déterminer avec exactitude si seules les cellules delta expriment le récepteur CCK<sub>B</sub> puisque nos résultats ne nous permettent pas d'exclure la possibilité que ce récepteur puisse aussi être localisé à la surface des cellules  $\alpha$  (alpha) à glucagon.

Finalement, le pancréas du porc et du fœtus humain possèdent une majorité de récepteurs CCK<sub>B</sub> contrairement au récepteur de type A que l'on retrouve surtout chez les rongeurs. S'il est vrai que seules les cellules  $\delta$  (delta) pancréatiques expriment le récepteur CCK<sub>B</sub>, comment pouvons-nous expliquer le contrôle de la sécrétion pancréatique chez le porc et l'humain en absence de récepteurs à CCK sur la cellule acinaire ? Récemment, l'insuline endogène a été rapportée comme étant un régulateur important de la sécrétion enzymatique chez le rat (LEE et al., 1990) et le chien (LEE et al., 1995). De plus, suivant la prise d'un repas ou encore en réponse à la sécrétine et à la CCK, l'immunoneutralisation de l'insuline circulante a inhibé complètement la sécrétion pancréatique provoquée par ces stimuli s'est et accompagnée d'une augmentation marquée de la somatostatine en circulation portale (LEE et al., 1994).

Donc le contrôle de la sécrétion pancréatique chez le porc et l'humain pourrait s'effectuer comme suit : d'abord ou tôt en réponse à un repas, la CCK circulante en provenance du duodénum et/ou des terminaisons nerveuses serait rapidement relâchée pour induire la sécrétion d'insuline via l'occupation du récepteur CCK<sub>A</sub> présent à la surface des cellules  $\beta$  (bêta) à insuline (BOURASSA et al., 1999; KARLSSON et AHREN, 1992) présentant une forte affinité pour la CCK de l'ordre du pM.

Plus tard suivant la prise du repas, la CCK issue des fibres nerveuses pourrait atteindre des niveaux de l'ordre du nM. Cette concentration de CCK assurerait l'occupation du récepteur CCK<sub>B</sub> présent à la surface des cellules  $\delta$  (delta) pancréatiques et pourrait occasionner un délai dans la relâche de somatostatine impliquée dans le contrôle de la sécrétion d'insuline (LINS et al., 1980) et des enzymes pancréatiques (SARFATI et MORISSET, 1989).

La présence du récepteur CCK<sub>B</sub> et sa localisation au niveau des cellules  $\delta$  (delta) du pancréas de rat, de souris, de porc et du fœtus humain semblent suggérer que la cholécystokinine et la gastrine puissent avoir un rôle important à jouer dans le contrôle du métabolisme et / ou la sécrétion de somatostatine par les cellules  $\delta$  pancréatiques.

En fait, ces deux hormones gastrointestinales stimulent de façon différentielle la relâche de somatostatine des cellules  $\delta$  de la glande gastrique de mouton; la cholécystokinine stimule la sécrétion de somatostatine via l'occupation des récepteurs  $CCK_A$  et  $CCK_B$  autant au niveau de l'antrum pylorique que du fundus tandis que la gastrine induit la relâche de somatostatine du fundus principalement via l'occupation du récepteur  $CCK_B$  et de l'antrum par l'occupation des deux types de récepteurs à cholécystokinine (ZAVROS et al., 1998). De plus, la spécificité de ces réponses a été confirmée par l'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs  $CCK_A$  et  $CCK_B$  soit le L-364, 718, et le L-365, 260 respectivement (ZAVROS et SHULKES, 1997). D'ailleurs, des études réalisées à l'aide de cultures primaires de cellules fundiques (SOLL et al., 1984) et de cellules  $\delta$  (delta) isolées d'estomacs de chien (DELVALLE et al., 1993) semblent elles aussi indiquer que la gastrine mais surtout la cholécystokinine sont impliquées dans la sécrétion de somatostatine. Des études supplémentaires sur les réponses physiologiques découlant de l'activation du récepteur  $CCK_B$  au niveau des cellules  $\delta$  (delta) du pancréas de rat, de souris, de porc et de l'humain nous permettront de démystifier l'implication de la cholécystokinine dans les fonctions endocrines pancréatiques associées à ce type cellulaire. Les résultats dont je vous ai fait part dans ce travail démontrent bien l'intérêt particulier de la recherche quant au besoin de comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation des fonctions gastrointestinales par le récepteur  $CCK_B$ .

## CHAPITRE V

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons réalisé certaines expériences qui ont mené à la caractérisation des récepteurs à la cholécystokinine au cours du développement pancréatique chez le rat ainsi que chez la souris, le porc et le fœtus humain. En ce qui a trait à la première partie de ce travail, celle reliée à l'étude du récepteur  $CCK_A$ , nos résultats ont permis de mettre en évidence l'ontogénie de l'ARNm du récepteur  $CCK_A$  chez le rat ; son patron d'expression démontre un certain parallélisme avec celui de la protéine récepteur. Ce dernier, retrouvé de façon prédominante au niveau de la membrane plasmique des cellules acineuses a de plus été identifié au niveau des cellules  $\beta$  (bêta) à insuline des îlots de Langerhans. Malgré une différence marquée dans leur poids moléculaire, les protéines du récepteur  $CCK_A$  du pancréas de souris (~160 kDa) et de rat (~40 et ~50 kDa) ont été localisées à la surface des mêmes cellules, soit les acini pancréatiques et les cellules  $\beta$  (bêta) à insuline des îlots de Langerhans. De plus, nous avons identifié ce récepteur à partir de fractions membranaire de pancréas foetal humain (~45 kDa) et de porc (~160 kDa) bien que la protéine n'aie été localisée uniquement au niveau des îlots de Langerhans chez le porc.



Dans la seconde partie de cette étude traitant du récepteur CCK<sub>B</sub>, nos résultats ont démontré que malgré le fait que l'expression de l'ARNm du récepteur CCK<sub>B</sub> n'ait été identifiée que par RT-PCR, l'analyse du patron d'expression de la protéine a toutefois permis de distinguer une bande d'environ 80 kDa dans le pancréas de rat. Cette protéine ne présente aucune modulation au cours du développement pancréatique. Tout comme dans le pancréas de rat, l'analyse Western de fractions membranaires de pancréas de souris a elle aussi permis d'identifier une protéine d'environ 80 kDa tandis que des protéines d'environ 50 kDa et 115 kDa ont respectivement été identifiées dans le pancréas de porc et de fœtus humain. La distribution de ce récepteur CCK<sub>B</sub> s'est avérée identique chez toutes les espèces étudiées soit, au niveau des cellules  $\delta$  (delta) à somatostatine des îlots de Langerhans alors que la gastrine, fortement exprimée au niveau des cellules  $\delta$  (delta) du pancréas endocrine du rat fœtal et du nouveau-né disparaît dès l'âge de 10 jours et demeure absente jusqu'à l'âge adulte.

Donc la gastrine pourrait être impliquée dans le contrôle de la croissance du pancréas endocrine au cours de la période fœtale et périnatale (effet autocrine) sur les cellules  $\delta$  (delta) à somatostatine mais, à la lumière de nos résultats, l'effet aplasique du L-365, 260, un antagoniste spécifique du récepteur CCK<sub>B</sub> au niveau du pancréas exocrine est difficilement explicable parce que le récepteur CCK<sub>B</sub> semble absent du tissu exocrine.

Cependant, le rôle majeur de la gastrine semblerait d'avantage associé à l'accumulation des contenus enzymatiques et protéiques du pancréas fœtal. En effet, un traitement chronique à la gastrine au cours de la gestation a provoqué dans le pancréas fœtal des augmentations des contenus enzymatiques et protéiques, signe d'une hypertrophie de la glande (MORISSET et al., 1999). Est-ce que cette hypertrophie du pancréas fœtal en réponse à la gastrine administrée au cours de la gestation chez le rat pourrait être associée à un effet potentiel de la gastrine sur la relâche de somatostatine des cellules  $\delta$  (delta) du pancréas qui, à son tour viendrait causer une inhibition de la sécrétion, ce qui pourrait expliquer cette accumulation des constituants cellulaires dans le tissu pancréatique fœtal (MORISSET et al., 1999)? Cette hypothèse reste à être vérifiée.

Nos observations sur l'expression du récepteur  $CCK_A$  au niveau des cellules  $\beta$  (bêta) du pancréas de rat, de souris et de porc ainsi que sur l'expression du récepteur  $CCK_B$  par les cellules  $\delta$  (delta) pancréatiques de ces mêmes espèces et du pancréas fœtal humain ouvrent les portes à un tout nouveau champ d'étude qui consisterait à déterminer le ou les rôles associés à l'occupation de ces récepteurs sur ces deux populations de cellules par la CCK. Cependant, la distribution du récepteur  $CCK_B$ , presque exclusive sur les cellules  $\delta$  reste à être clarifiée puisque nos résultats ne nous permettent pas d'éliminer avec certitude la possibilité que ce récepteur puisse aussi être localisé sur les cellules  $\alpha$  à glucagon.

L'effet stimulateur de la CCK, via l'occupation du récepteur CCK<sub>A</sub> sur la sécrétion d'insuline est bien documenté chez la souris (KARLSSON et AHREN, 1992). Ces études réalisées à la fois *in vivo* (KARLSSON et AHREN, 1989; REAGAN et al., 1987) et *in vitro* (KARLSSON et AHREN, 1991; ZAWALICH et al., 1988) ont permis de démontrer que la sécrétion d'insuline provoquée en réponse à la CCK était inhibée par le L-364 718 (antagoniste spécifique du récepteur CCK<sub>A</sub>) (CHANG et LOTTI, 1986; EVANS et al., 1986). Il n'en est pas de même pour la somatostatine contenue dans les cellules  $\delta$  pancréatiques. En fait, très peu d'informations sont disponibles à ce jour concernant le contrôle de la synthèse et de la sécrétion de la somatostatine pancréatique et encore moins sur les facteurs impliqués dans la régulation de la croissance de cette toute petite population de cellules endocrines.

La somatostatine, sécrétée par les cellules  $\delta$  (delta) du pancréas et de la glande gastrique fundique et antrale a plusieurs effets significatifs sur le système digestif (Tableau 4) ; elle inhibe la relâche de plusieurs hormones gastro-intestinales, bloque les fonctions exocrines du pancréas et de l'estomac tout en diminuant la motilité de l'estomac et de l'ensemble du système gastro-intestinal (BURROUGHERS et MCCORMICK, 1991) tout en inhibant, de façon générale la prolifération cellulaire (TULASSAY, 1998).

Ces effets sur la croissance du pancréas exocrine sont bien établis. L'administration chronique de somatostatine diminue de façon significative l'incorporation de thymidine tritiée dans le pancréas de rat (MORISSET et al., 1982). De plus, elle inhibe la croissance amenée par la caeruleine (MORISSET et al., 1984). Elle agirait donc comme modérateur du développement pancréatique.

Toutefois, les effets *in vivo* de la somatostatine sur le pancréas endocrine sont surtout associés à une inhibition de la fonction sécrétoire plutôt qu'à une inhibition de la croissance. Elle agit de façon paracrine pour inhiber la relâche d'insuline et de glucagon (ENGELKING, 1997).

**Tableau 4      Effets inhibiteur de la somatostatine sur le système gastroentéropancréatique.**

---

**Sécrétion d'hormones gastrointestinales (*inhibition*)**

gastrine, cholécystokinine, VIP,  
glucagon, insuline, motiline,  
GIP, polypeptide pancréatique,  
sécrétine

**Sécrétion exocrine (*inhibition*)**

acide gastrique, pepsine,  
bicarbonate pancréatique,  
enzymes pancréatiques, bile

**Motilité (*inhibition*)**

vidange gastrique,  
contractions de la vésicule biliaire,  
péristaltisme intestinale

**Absorption (*réduction*)**

calcium, glucose, galactose,  
glycérol, fructose,  
lactose, acides aminés,  
triglycérides, eau

**Circulation**

augmente la résistance vasculaire

**Croissance (*inhibition*)**

prolifération cellulaire

---

Modifié de TULASSAY, (1998)

Maintenant, est-ce que la CCK pourraient affecter la synthèse de la somatostatine pancréatique chez le rat par occupation du récepteur de type B présent sur les cellules  $\delta$  (delta) du pancréas? Certains facteurs ont déjà été identifiés pouvant moduler la synthèse de la somatostatine dans différents modèles cellulaires ; le GHRF (growth hormone releasing factor) et le FGF (fibroblast growth factor) stimulent la synthèse de somatostatine dans les cellules 44-2C (ZEYTIN et al., 1988) tandis que l'IGF-I et l'IGF-II (insulin growth factor) stimulent la synthèse de somatostatine dans les cellules RIN 1027 B2 (FEHMANN et al., 1996). La pentagastrine agit elle aussi sur la synthèse de la somatostatine dans le pancréas de rat *in vivo* (ALVARO-ALONSO et al., 1994).

De plus, est-ce que la CCK pourraient affecter la sécrétion de la somatostatine par occupation du récepteur de type B présent sur les cellules  $\delta$  (delta) du pancréas? La régulation de la sécrétion de la somatostatine en réponse à différents stimuli a déjà fait l'objet de plusieurs études.

Chez le rat, les agonistes  $\beta$ -adrénergiques stimulent sa sécrétion (pancréatique et gastrique) alors que les agonistes  $\alpha$ -adrénergiques l'inhibent *in vivo* (KOOP et al., 1980). La somatostatine est sécrétée en réponse à l'acétylcholine chez le rat (perfusion de pancréas isolés) (KIMURA et al., 1982) et chez le chien *in vivo* (KANETO et al., 1981).

La CCK et la gastrine, qui agissent respectivement via les récepteurs CCK<sub>A</sub> et CCK<sub>B</sub> stimulent la sécrétion gastrique de somatostatine chez l'homme *in vivo* (ESCOURROU et al., 1985), le chien *in vivo* (ROUILLER et al., 1980) ainsi que sur des îlots de Langerhans isolés de rat (VERSPOHL et al., 1987) tel que le fait la sécrétine (CHIBA et al., 1980; ESCOURROU et al., 1985; ROUILLER et al., 1980). Suite à ces observations, il serait de mise de vérifier si l'occupation du récepteur CCK<sub>B</sub> par la caeruleine, un analogue de la CCK, affecterait *in vivo* l'expression de l'ARNm de la somatostatine pancréatique, sa synthèse, les contenus et la relâche de cette hormone dans le pancréas de rat. Ensuite, il serait intéressant de vérifier si l'expression du transgène du récepteur CCK<sub>B</sub> humain au niveau du pancréas chez la souris (SAILLAN-BARREAU et al., 1998) ou encore son 'knockout' (LANGHANS et al., 1997; MIYASAKA et al., 1999) pourrait interférer avec le maintien de la population des cellules  $\delta$  (delta) pancréatiques, l'expression de l'ARNm de la somatostatine, sa synthèse, les contenus et la relâche de cette hormone dans le pancréas de rat. Souvenons-nous que ces souris 'adultes' se développent normalement malgré une hypergastrinémie, une atrophie marquée de la muqueuse gastrique signe du rôle important de ce récepteur dans la croissance de cette muqueuse *in vivo* mais ne présentent aucune anomalie pancréatique à cette période du développement. Toutefois, elles présentent une diminution de 43% de la population des cellules  $\delta$  (delta) retrouvées dans l'antrum pylorique.

En est-il de même pour les cellules  $\delta$  pancréatiques ainsi que pour la gastrine produite par ces cellules à la période fœtale et périnatale du développement? L'implication possible de la gastrine dans le contrôle du statut de différenciation et à la maturation du pancréas fœtal serait-elle affectée? Toutes ces questions restent à être clarifiées spécialement tôt au cours du développement de ces souris 'knockout'.

De plus, des études *in vitro*, à l'aide de lignées cellulaires pancréatiques issues de tumeurs cancéreuses endocrines tel que les cellules 44-2C (ZEYTIN et al., 1988), RIN T3 (LHERISSON et al., 1989) et RIN 1027 B2 (FEHMANN et al., 1996) qui sécrètent de la somatostatine nous permettraient d'établir si l'occupation du récepteur  $CCK_B$  par la CCK influence directement et physiologiquement le métabolisme de la somatostatine ou indirectement en stimulant la synthèse de facteurs de croissances qui agiraient par autocrinie.

De tel effets ont déjà été mis en évidence dans les lignées cellulaires pancréatiques cancéreuses humaines MIAPaCa-2 et PANC-1 où la gastrine et l'IGF-I stimulent la prolifération cellulaire de façon autocrine (DOUZIECH et al., 1998).



Aussi, dans le but d'établir si le récepteur CCK<sub>B</sub> agit en tant que joueur clef dans la régulation de la croissance des cellules  $\delta$ , il serait intéressant de vérifier, *in vitro* si son occupation par la CCK influence directement la croissance de ces cellules ou indirectement en stimulant la synthèse de différents facteurs de croissance tels que le EGF, le FGF, le HGF, l'IGF-I et l'IGF-II qui agiraient alors par autocrinie. L'utilisation de méthodes telles que l'amplification PCR, l'analyse Northern et l'immunofluorescence indirecte nous permettra d'identifier la présence de ces différents facteurs de croissance et / ou leurs récepteurs tel que décrit pour le HGF et son récepteur c-met (CALVO et al., 1996), l'IGF-I et son récepteur (CALVO et al., 1993) ainsi que pour le bFGF et son récepteur FGF-1 (CALVO et al., 1997).

De plus, l'addition d'anticorps spécifiques à ces différents facteurs de croissance dans le milieu de culture nous permettra de confirmer si l'effet de la CCK est véritablement direct.

Finalement, une analyse approfondie des voies intracellulaires de transduction conduisant à l'activation ainsi qu'à la progression du cycle cellulaire dans ces lignées cancéreuses en réponse à l'activation du récepteur CCK<sub>B</sub> nous permettra de mieux comprendre les divers rôles de la CCK dans le maintien des fonctions pancréatiques endocrines chez différentes espèces.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Jean-Alfred Morisset, pour sa disponibilité, ses précieux conseils ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant au sein de son équipe. Je lui suis tout particulièrement reconnaissante de m'avoir permis de développer des aptitudes, tant sur le plan scientifique que personnel, qui me seront utiles tout au long de ma carrière. Aussi, au cours de mon passage dans son laboratoire ai-je eu le grand plaisir et la chance de travailler et d'échanger avec des personnes ressources qui m'ont transmis le goût du savoir et du travail bien fait. Par la présente, je tiens à remercier Jean Lainé et Ézéquier-Louis Calvo dont la contribution a été, sans contredit, essentielle à la réalisation de ma maîtrise.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance aux Dre Nathalie Rivard et Dr Robert Day pour avoir évalué ce mémoire. Un merci tout particulier à l'attention du Dre Nathalie Rivard pour son soutien et ses encouragements.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents pour m'avoir inculqué des valeurs qui m'ont permis d'en arriver là où j'en suis. Merci pour votre appui, votre confiance mais surtout, d'être toujours là pour moi.

## **BIBLIOGRAPHIE**

ADLER, G., BEGLINGER, C., BRAUN, U., REINSHAGEN, M., KOOP, I., SCHAFMAYER, A., ROVATI, L. AND R. ARNOLD (1991). Interaction of the cholinergic system and cholecystokinin in the regulation of endogenous and exogenous stimulation of pancreatic secretion in humans. *Gastroenterology* 100 :537-543.

ADLER, G. (1997). Regulation of human pancreatic secretion. *Digestion* 58 :39-41.

AURANG, K., SPRAGGS, C.F., JORDAN, C. AND K.C. LLOYD (1997). Role of gastrin/CCK-B receptors in meal-stimulated acid secretion in rats. *Am. J. Physiol.* 272 :G1243-G1248.

AVARO-ALONSO, I., MUNOZ-ACEDO, G. AND E. ARILLA (1994). Effect of pentagastrin on the somatostatin receptor / effector system in rat pancreatic acinar membranes. *Regul. Peptides* 54 :479-487.

BACA, I., FEURLE, GE., HAAS, N. AND T. MERNITZ (1983). Interaction of neurotensin, cholecystokinin and secretin in the stimulation of the exocrine pancreas in the dog. *Gastroenterology* 84 :556-561.

BALDWIN, G.S. (1993). Gastrin receptor structure. *Gastrin*. J.H. WALSH ÉDITEUR. New York, Raven Press. Pp. 195-207.

BALDWIN, G.S. (1994). Antiproliferative gastrin/cholecystokinin receptor antagonists target the 78-kDa gastrin-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7593-7597.

BARDAM, L., HILSTED, L. AND J.F. REHFELD (1990). Progastrin expression in mammalian pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 :298-302.

BAYLISS, W.M., AND E.H. STARLING (1902). *Proc. Roy. Soc.* 69 :352.

B EGLINGER, C., HILDEBRAND, P., ADLER, G., WERTH, B., LUO, H., DELCO, F. AND K GYR (1992). Postprandial control of gallbladder contraction and exocrine pancreatic secretion in man. *Eu. J. Clin. Invest.* 22 :827-834.

BERNARD, J.P., LÉVY, P., MOREAU, J. AND C. ROSÉ (1998). Exploration de la sécrétion pancréatique exocrine. Éditions Médicales Internationales, Distribué par les Laboratoires Parke-Davis, France. Pp. 11-90.

BLANDIZZI, C., SONG, I. AND T, YAMADA (1994). Molecular cloning and structural analysis of rabbit gastrin/CCKB receptor gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 :947-953.

BOLD, R.J., ISHIZUKA, J., TOWNSEND Jr, C.M. AND J.C. THOMPSON (1994). Gastrin stimulates growth of human colon cancer cells via a receptor other than CCK-A and CCK-B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 :1222-1226.

BOLENDER, R.P. (1974). Stereological analysis of the guinea pig pancreas. I. Analytical model and quantitative description of non stimulated pancreatic exocrine cells. J. Cell Biol. 61 :269-287.

BOURASSA, J., LAINÉ, J., KRUSE, M.L., GAGNON, M.C. AND J. MORISSET (1999). Ontogeny and species differences in the pancreatic expression and localization of the CCKA receptors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 260 :820-828.

BOZKURT,T., ADLER, G., KOOP, I. AND R. ARNOLD (1988). Effect of atropine on intestinal phase of pancreatic secretion in man. *Digestion* 41 :108-115.

BRAND, S.J. AND P.J. FULLER (1988). Differential gastrin gene expression in rat gastrointestinal tract and pancreas during neonatal development. *J. Biol. Chem.* 263 :5341-5347.

BRANNON, P. (1990) Adaptation of the exocrine pancreas to diet. *Annu. Rev. Nutr.* 36 :255-275.

BURKITT, G.H. AND P.R. WEATHER (1988). *Le pancréas et le foie. Meds, MCGRAW-HILL ÉDITEUR. Paris. P. 350.*

BURROUGHES, A.K. AND P.A. MC CORMICK (1991). Somatostatin and octreotide in gastroenterology. *Aliment. Pharmacol. Therap.* 5 :331-341.

CALVO, E.L., BERNATCHEZ, G., LACHANCE, Y., PELLETIER, G. AND J. MORISSET (1993). Insulin-like growth factors (IGFs) 1 and 2, IGF-1 receptor and IGF-binding proteins 1 and 3 gene expression during pancreas regeneration in rats. *Digestion* 54 :268.

CALVO, E.L., BOUCHER, C., PELLETIER, G. AND J. MORISSET (1996).  
Ontogeny of hepatocyte growth factor and c-met/hgf receptor in rat pancreas.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 229 :257-263.

CALVO, E.L., DESCHÊNES, C., BOURASSA, J. AND J. MORISSET (1997).  
Overexpression of bFGF and FGF-1 receptor mRNA during pancreatic  
regeneration in rats. Pancreas 15 :431.

CHANG, R.S.L., LOTTI, V.J. AND R.L. MONAGHAN (1985). A potent  
nonpeptide cholecystokinin antagonist selective for peripheral tissues isolated from  
*Aspergillus alliaceus*. Science 230 :177-179.

CHANG, R.S.L. AND V.J. LOTTI (1986). Biochemical and pharmacological  
characterization of an extremely potent and selective nonpeptide cholecystokinin  
antagonist. Proc. Natl. Acad. Sci. 83 :4923-4926.

CHERNER, J.A., SUTLIFF, V.E., GRYBOWSKI, D.M., JENSEN, R.T. AND J.D.  
GARDNER (1988). Functionally and distinct receptors for cholecystokinin and  
gastrin on dispersed chief cells from guinea pig stomach. Am. J. Physiol.  
254 :G151-G155.

CHEVET, E., LEMAITRE, G. AND M.D. KATINKA (1995). Rapid and efficient transfert of high molecular weight RNA on to positively charged nylon membranes. *Biotechniques* 18 :578-580.

CHEW, C.S. AND M.R. BROWN (1986). Release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and elevation of intracellular triphosphate by secretagogues in parietal and chief cells isolated from rabbit gastric mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 888 :116-125.

CHEW, C.S., NAKAMURA, K. AND M. LJUNGSTROM (1992). Calcium signaling mechanisms in the gastric parietal cell. *Yale J. Biol. Med.* 65 :561-576.

CHIBA, T., TAMINATO, T., KADOWASI, S., INOUE, Y., MORI, K., SEINO, Y., ABE, H., CHIHARA, K., MATSUKURA, S., FUJITA, T. AND Y. GOTO (1980). Effects of various gastrointestinal peptides on gastric somatostatin release. *Endocrinology* 106 :145-149.

CHIBA, T., FISHER, S.K., PARK, J., SEGUIN, E.B., AGRANOFF, B.W. AND T. YAMADA (1988). Carbamylcholine and gastrin induce inositol lipid turnover in canine gastric parietal cells. *Am. J. Physiol.* 255 :G99-G105.



CHIRGWIN, J.M., PRZYBYLA, A.E., MACDONALD, R.J. AND W.J. RUTTER (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18 :5294-5299.

CHUANG, C.N., CHEN, M.C.Y. AND A.H. SOLL (1991). Gastrin-histamine interactions :direct and paracrine elements. *Scand. J. Gastroenterol.* 26 :95-102.

CLERC, P., DUFRESNE, M., SAILLAN, C., CHASTRE, E., ANDRE, T., ESCRIEUT, C., KENNEDY, K., VAYSSE, N., GESPACH, C. AND D. FOURMY (1997). Differential expression of CCK-A and CCK-B/gastrin receptor genes in human cancers of esophagus, stomach and colon. *Int. J. Cancer* 72 :-931-936.

CRAWLEY, J.N. AND R.L. CORWIN (1994). Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 15 :731-755.

CUBER, J.C., CORRING, T., LEVENEZ, F., BERNARD, C. AND J.A. CHAYVIALLE (1989). Effects of cholecystokinin octapeptide on the pancreatic exocrine secretion in pig. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67 :1391-1397.

DABROWSKI, A., GROBLEWSKI, G.E., SCHÄFER, C., GUAN, K.-L. AND J.A. WILLIAMS (1997). Cholecystokinin and EGF activate a MAPK cascade by different mechanisms in rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.* 273 :C1472-C1479.

DAULHAC, L., KOWALSKI-CHAUVEL, A., PRADAYROL, L., VAYSSE, N. AND C. SEVA (1997).  $\text{Ca}^{2+}$  and protein kinase C-dependent mechanisms involved in gastrin-induced Shc/Grb2 complex formation and p44-mitogen-activated protein kinase activation. *Biochem. J.* 325 :383-389.

DELVALLE, J., SUGANO, K. AND T. YAMADA (1987). Progastrin and its glycine-extended posttranslational processing intermediates in human gastrointestinal tissues. *Gastroenterology* 92 :1908-1912.

DELVALLE, J., CHIBA, T., PARK, J. AND T. YAMADA (1993). Distinct receptors for cholecystokinin and gastrin on canine fundic D-cells. *Am. J. Physiol.* 264 :G811-G815.

DENYER, J., GRAY, J., WONG, M., STOLZ, M. AND S. TATE (1994). Molecular and pharmacological characterization of the human  $\text{CCK}_B$  receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 268 :29-41.

DESBOIS, C., LE HUËROU-LURON, I., DUFRESNE, M., ESTIVAL, A., CLERC, P., ROMÉ, V., CLEMENTE, F., GUILLOTEAU, P. AND D. FOURMY (1999). The CCK<sub>B</sub> /gastrin receptor is coupled to the regulation of enzyme secretion, protein synthesis and p70 S6 kinase activity in acinar cells from ElasCCKB transgenic mice. Eur. J. Biochem. 266 :1003-1010.

DE WEERTH, A., PISEGNA, J.R., HUPPI, K. AND S.A. WANK (1993a). Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of the human cholecystokinin type A receptor. Biochem Biophys. Res. Commun. 194 :811-818.

DE WEERTH, A., PISEGNA, J.R. AND S.A. WANK (1993b). Guinea pig gallbladder and pancreas possess identical CCK-A receptor subtypes :receptor cloning and expression. Am. J. Physiol. 265 :G1116-G1121.

DOCKRAY, G.J., VARRO, A. AND R. DIMALINE (1996). Gastric endocrine cells :Gene expression, processing, and targeting of active products. Physiol.Res. 76 :767-798.

DOUZIECH, N., LAJAS, A., COULOMBE, Z., CALVO, E., LAINÉ, J. AND J. MORISSET (1998). Growth effects of regulatory peptides and intracellular signaling routes in human pancreatic cancer cell lines. *Endocrine* 9 :171-183.

DUFRESNE, M., ESCRIEUT, C., CLERC, P., LE HUËROU-LURON, I., PRATS, H., BERTRAND, V., LE MEUTH, V., GUILLOTEAU, P., VAYSSE, N. AND D. FOURMY (1996). Molecular cloning, developmental expression and pharmacological characterization of the CCKB/gastrin receptor in the calf pancreas. *Eur. J. Pharmacol.* 297 :165-179.

ELSÄSSER, H.P., ADLER, G. AND H.F. KERN (1986). Time course and cellular source of pancreatic regeneration following acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 1 :421-429.

ENGELKING, L.R. (1997). Physiology of the endocrine pancreas. *Seminars in veterinary Medicine and surgery (Small Animal)* 12 :224-229.

ERLANDSEN, S.L., HEGRE, O.D., PERSONS, J.A., MCEVOY, R.C. AND R.P. ELDE (1976). Pancreatic islet cell hormones distribution of cell types in the islet and evidence for the presence of somatostatin and gastrin within the D cell. *J. Histochem. Cytochem.* 24 :883-897.

ESCOURROU, J., PRADAGROL, L., CHAYVIALLE, J.A., FAGOT-REVURAT, P., PUDEBAT, M. AND A. RIBET (1985). Presence of hormonal polypeptides in the pure pancreatic secretion in man under stimulation by caerulein and secretin. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 9 :782-786.

EVANS, B.E., BOCK, M.G. AND K.E. RITTLE (1986). Design of potent, orally effective, nonpeptidal antagonists of the peptide hormone cholecystokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 :4918-4922.

FARRELL, R.E. (1993). *RNA methodologies a laboratory guide for isolation and characterization.* Academic Press. P.317.

FEHMANN, H.C., JEHLE, P., MARKUS, U. AND B. GÖKE (1996). Functional active receptors for insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II on insulin, glucagon, and somatostatin-producing cells. *Metabolism* 45 :759-766.

FINLEY, M., KOSKI, R.A., MELHEM, M.F., PIPAS, J.M. AND A.I. MEISLER (1993). Expression of gastrin gene in the normal human and colorectal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 53 :2919-2926.

FOURMY, D., ZAHIDI, A., FABRE, R., GUIDET, M., PRADAYROL, L. AND A. RIBET (1987). Receptors for cholecystokinin and gastrin peptides display specific binding properties and are structurally different in guinea pig and dog pancreas. *Eur. J. Biochem.* 165 :683-692.

FUNAKOSHI, A., MIYASAKA, K., SKANAI, S., MASUDA, M., YASUNAMI, Y., NAGAI, T., IKEDA, S., JIMI, A., KAWANAMI, T. AND A. KONO (1996a). Pancreatic endocrine dysfunction in rats not expressing the cholecystokinin-A receptor. *Pancreas* 12 :230-236.

FUNAKOSHI, A., MIYASAKA, K., SHINOZAKI, H., ARITA, Y., NAKANO, I. AND H. NAWATA (1996b). Regulation of pancreatic exocrine function in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats without gene expression of cholecystokinin-A receptor. *Int. Med.* 35 :249-256.

FUNAKOSHI, A., FUKAMIZU, Y. AND K. MIYASAKA (1999). Mechanism of cholecystokinin-A-receptor antagonist on human pancreatic exocrine secretion. *Digestion* 60 :75-80.

GAGNON, M.C., CALVO, E., PELLETIER, G. AND J. MORISSET (1994). Expression of CCKA and CCKB receptors mRNA in foetal and postnatal rat pancreas. *Gastroenterology* 106 :293.

GARDNER, J.D. AND R.T. JENSEN (1980). Receptor for secretagogues on pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.* 238 :G63-G66.

GITHENS, S. (1988). The pancreatic duct cell : proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation and culture. *J. Pediat. Gastroenterol. Nutrition* 7 :486-506.

GLASEL, J.A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratio. *Biotechniques* 18 :62-63.

GORELICK, F.S. AND J.D. JAMIESON (1994). The pancreatic acinar cells. Structure-function relationships. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, JOHNSON, L.R., CHRISTENSEN, M.J., JACOBSON, E.D., WALSH, J.H. ÉDITEURS. New York, Raven Press.

HADJIIVANOVA, C., DUFRESNE, M., POIROT, S., SOZZANI, P., VAYSSE, N., MORODER, L. AND D. FOURMY (1992). Pharmacological and biochemical characterization of cholecystokinin/gastrin receptors in developing rat pancreas. Age-related expression of distinct receptor glycoforms. Eur. J. Biochem. 204 :273-279.

HAHNE, W.F., JENSEN, R.T., LEMP, G.F. AND J.D. GARDNER (1981). Proglumide and benzotrip :Members of different class of cholecystokinin receptor antagonists. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 :6304-6308.

HAKANSON, R., ALEXSON, J., EKMAN, R. AND F. SUNDLER (1988). Hypergastrinemia evoked by omeoprazole stimulates growth of gastric mucosa but not of pancreas or intestines in hamsters, guinea pig and chicken. Regulatory Peptides 23 :105-115.

HELANDER, H.F., WONG, H., POORKHAKALI, N. AND J.H. WALSH (1997). Immunohistochemical localization of gastrin/CCK-B receptors in the dog and guinea-pig stomach. Acta Physiol. Scand. 159 :313-320.

HICKSON, J.C.D. (1981). The secretion of pancreatic juice in response to stimulation of the vagus nerves in the pig. J. Physiol. Lond. 206 :275-297.



HÖKFELT, T., SCHULZBERG, M. AND J.M. LUNBERG (1982). Distribution of vasoactive intestinal peptide in the central and peripheral systems as remarked by immunohistochemistry. Vasoactive Intestinal Peptide, D. SAID ÉDITEUR. New York, Raven Press. Pp. 65-90.

HOLST, J.J., SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O.B.F. AND J. FAHRENKRUG (1979). Nervous control of pancreatic exocrine secretion in pigs. Acta Physiol. Scand. 105 :33-51.

HOOSEIN, N.M., KIENER, P.A., CURRY, R.C., ROVATI, L.C., McGILBRA, D.K. AND M.G. BRATTAIN (1988). Antiproliferative effects of gastrin receptor antagonists and antibodies to gastrin on colon and gastric tumour cells cultured in vitro. Br. J. Surg. 75 :342-345.

HUANG, S.-C., FORTUNE, K.P., WANK, S.A., KOPIN, A.S. AND J.D. GARDNER (1994). Multiple affinity states of different cholecystokinin receptors. J. Biol. Chem. 269 :121-126.

ICHIKAWA, T., ISHIARA, K., NOZUE, K., MIYAZAWA, S., NEMOTO, N. AND K. HOTTA (1998). Serum and antral gastrin levels in fed and fasted rats :relation to aging. Comp. Biochem. Physiol. 121 :223-228.

INNIS, R. AND S.H. SNYDER (1980). Distinct cholecystinin receptors in brain and pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77 :6917-6921.

ISHIZUKA, J., TOWNSEND Jr, C.M., BOLD, R.J., MARTINEZ, J., RODRIGUEZ, M. AND J.C. THOMPSON (1994). Effects of gastrin on 3',5'-cyclic adenosine monophosphate, intracellular calcium, and phosphatidylinositol hydrolysis in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 54 :2129-2135.

IWAI, K., FUKUOKA, S.I., FUSHIKI, T., KODAIRA, T. AND N. IKEI (1986). Elevation of plasma CCK concentration after intestinal administration of a pancreatic enzymes secretion-stimulating peptide purified from rat bile-pancreatic juice: analysis with N-terminal region specific radioimmunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136 :701-706.

JENSEN, R.T., HUANG, S.C., VON SCHRENCK, T., WANK, S.A. AND J.D. GARDNER (1990). Cholecystinin receptor antagonists : ability to distinguish various classes of cholecystinin receptor. *Gastrointestinal Endocrinology : Receptor and Post-receptor Mechanisms.* THOMPSON, J.T., TOWNSEND, C.M., GREELY, G.A., RAYFORD, P.L., COOPER, C.W., SINGH, P.O. ET N. RUBIN ÉDITEURS. New York, Academic. Pp. 95-113.

JORPES, E., AND V. MUTT (1966). Cholecystokinin and pancreozimin : one specific hormone. *Acta Physiol. Scand.* 66 :196-202.

KANETO, A., SATO, H., AND T. KANEKO (1981). Stimulation of somatostatin, pancreatic polypeptide, glucagon and insulin secretion by acetylcholine infused intrapancreatically in dogs. *Biomed. Res.* 2 :57-66.

KARLSSON, S. AND B. AHREN (1989). Effects of three different cholecystokinin receptor antagonists on basal and stimulated insuline and glucagon secretion in mice. *Acta Physiol. Scand.* 135 :271-278.

KARLSSON, S. AND B. AHREN (1991). CCK<sub>A</sub> receptor antagonist inhibits mechanism underlying CCK-8-stimulated insulin release in isolated rats islets. *Eur. J. Pharmacol.* 202 :253-257.

KARLSSON, S. AND B. AHREN (1992). CCK-8-stimulated insulin secretion in vivo is mediated by CCKA receptors. *Eur. J..Pharmacology* 213 :145-146.

KENNEDY, K., ESCRJEUT, C., DUFRESNE, M., CLERC, P., VAYSSE, N AND D. FOURMY (1995). Identification of a region of the N-terminal of the human CCK-a receptor essential for the high affinity interaction with agonist CCK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213 :845-852.

KIMURA, H., KATAGIRI, K., OHNO, T., HARADA, N., IMANISHI, H., IWASAKI, M., ITO, M. AND T. TAKEUCHI (1982). Effect of acetylcholine and new cholinergic derivative on amylase output, insulin, glucagon and somatostatin secretions from perfused isolated rat pancreas. *Horm. Metabol.* 14 :356-360.

KONTUREK, S.J., TASLER, J. AND W. OBTULOWICZ (1972). Effect of atropine on pancreatic responses to endogenous and exogenous cholecystokinin. *Am. J. Dig. Dis.* 17 :911-917.

KOOP, H., BEHRENS, I., MCINTOSH, C.H.S., PEDERSON, R.A. AND R. ARNOLD (1980). Adrenergic modulation of gastric somatostatin release in rats. *FEBS Lett.* 118 :248-250.

KOPIN, A.S., LEE, Y.-M., MCBRIDE, E.W., MILLER, L.J., LU, M., LIN, H.Y., KOLAKOWSKI, L.F. AND M. BEINBORN (1992). Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 :3605-3609.

KULAKSIZ, H., ARNOLD, R., BURKHARD, G., MARONDE, E., MEYER, M., FAHRENHOLZ, F., FORSSMAN, W.G. AND R. EISSELE (2000). Expression and cell-specific localization of the cholecystokinin B/gastrin receptor in human stomach. *Cell Tissus Res.* 299 :289-298.

LACOURSE, K.A., LAY, J.M., SWANBERG, L.J., JENKINS, C. AND L.C. SAMUELSON (1997). Molecular structure of the mouse CCK-A receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 630-635.

LANGHANS, N., RINDI, G., CHIU, M., REHFELD, J.F., ARDMAN, B., BEINBORN, M. AND A.S. KOPIN (1997). Abnormal gastric histology and decreased acid production in cholecystokinin-B/gastrin receptor-deficient mice. *Gastroenterology* 112 :280-286.

LAROSE, L., AND J. MORISSET (1977). Acinar cell responsiveness to urecholine in the rat pancreas during fetal and early postnatal growth. *Gastroenterology* 73 :530-533.

LARSSON, L.I., REHFELD, J.F. AND N. GOLTERMANN (1977). Gastrin in the fetus. Distribution and molecular forms of gastrin in the antro-pyloric gland area, duodenum and pancreas. *Scand. J. Gastroenterology* 12 :869-872

LARSSON L.I. (1979a). Innervation of the pancreas by substance P, enkephalin, vasoactive intestinal peptide and gastrin-CCK immunoreactive cells. *J. Histochem. Cytochem.* 27 :1283-1284.

LARSSON, L.I. AND J.F. REHFELD (1979b). Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system. *Brain Res.* 165 :201-218.

LE DRÉAN, G., LE HUËRON-LURON, I., GESTIN, M., DESBOIS, C., ROMÉ, V., BERNARD, C., DUFRESNE, M., MORODER, L., GULLY, D., CHAYVIALLE, J.-A., FOURMY, D. AND P. GUILLOTEAU (1999). Exogenous CCK and gastrin stimulate pancreatic exocrine secretion via CCK-A but also via CCK-B/gastrin receptors in the calf. *Eur. J. Physiol.* 438 :86-93.

LEE, K.Y., KRUSCH, D., ZHOU, L., SONG, Y., CHANG, T.M. AND W.Y. CHEY (1995). Effects of endogenous insulin on pancreatic exocrine secretion in perfused dog pancreas. *Pancreas* 11 :1901-1905.

LEE, K.Y., LEE, Y.L., KIM, C.D., CHANG, T.M. AND W.Y. CHEY (1994). Mechanism of action of insulin on pancreatic exocrine secretion in perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.* 267 :G207-G212.

LEE, K.Y., ZHOU, L., REN, X.S., CHANG, T.M. AND W.Y. CHEY (1990). An important role of endogenous insulin on pancreatic secretion in rats. *Am. J. Physiol.* 268 :8164-8169.

LEE, Y.M., BEINBORN, M., MCBRIDE, E.W., LU, M., KOLAKOWSKI, L.F. AND S.A. KOPIN (1993). The human brain cholecystokinin-B/gastrin receptor. Cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* 268 :8164-8169.

LEHRACH, H., DIAMOND, D., WOZNEY, J.M., AND H. BOEDTKER (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16 :4743-4751.

LE MEUTH, V., PHILOUSE-ROME, V., HUEROU-LURON, I., FORMAL, M., VAYSSE, N., GESPACH, C., GUILLOTEAU, P. AND M. FOURMY (1993). Differential expression of A- and B-subtypes of cholecystokinin/gastrin receptor in developing calf pancreas. *Endocrinology* 133 :1182-1191.

LEUNG, Y.K., LEE, P.C. AND E. LEBENTHAL (1986) Maturation of cholecystokinin receptors in pancreatic acini of rats. *Am. J. Physiol.* 250 : G594-G597.

LÉVY, E. (1998). Exploration de la sécrétion pancréatique exocrine. Éditions Médicales Internationales, Condé-sur-Noireau, France. Pp.11-90

LHERISSON, C., ESTIVAL, A., PRADAYROL, L. AND N. VAYSSE (1989). HPLC analysis of somatostatin peptides secreted by a rat pancreatic endocrine cell line (RIN T3) : stimulation studies. *Horm. Res.* 32 :67-70.

LHOSTE, E.F., GUEUGNEAU, A.M., GAROFANO, A., PHILIPPE, C., LEVENEZ, F. AND T. CORRING (1995). Role of CCK in the regulation of secretion and adaptation in the pig pancreas. *Pancreas* 11 :86-94.



LIGNON, M.F., BERNAD, N. AND J. MARTINEZ (1991). Pharmacological characterization of type B cholecystokinin binding sites on the human JURKAT T lymphocyte cell line. *Mol. Pharmacol.* 39 :615-620.

LINS, P.E., PETERSSON, B. AND S. EFENDIC (1980). Effects of short-term and prolonged infusions of somatostatin on endocrine pancreas, body weight and food intake in rats. *Acta Physiol. Scand.* 110 :267-275.

LLOYD, K.C.K., RAYBOULD, H.E., TACHÉ, Y. AND J.H. WALSH (1992). Role of gastrin, histamine, and acetylcholine in the gastric phase of acid secretion in anesthetized rats. *Am. J. Physiol.* 262 :G747-G754.

LOTTI, V.J., AND R.S.L. CHANG (1989). A new potent and selective non-peptide gastrin antagonist and brain cholecystokinin receptor (CCK-B) ligand :l-365 260. *Eur. J. Pharmacol.* 162 :273-280.

LOUIE, D.S., MAY, D., MILLER, D. AND C. OWYANG (1986). Cholecystokinin mediates feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in rats. *Am. J. Physiol.* 250 :G252-G259.

LU, L., LOUIE, D. AND C. OWYANG (1989). A cholecystokinin releasing peptide mediates feedback regulation of pancreatic secretion. Am. J. Physiol. 256 : G430-G435.

MAGHIMZADEH, E., EKMAN, R., HÄKÄSON, R., YANAIHARA, N. AND F. SUNDLER (1983). Neuronal gastrin-releasing peptide in the mammalian gut and pancreas. Neuroscience 10 :553-563.

MAJUMDAR, A.P.N. AND N. GOLTERMANN (1979). Chronic administration of pentagastrin. Effects on pancreatic protein and nucleic acid contents and protein synthesis in rats. Digestion 19 :144-147.

MAJUMDAR, A.P.N. (1984). Gastrin ontogeny and gastric mucosal growth during development. 19 :13-19.

MARTINI, S.H., TIMMONS, M.J. AND M.P. MCKINLEY (2000). Human anatomy. Troisième édition. P.F. CORREY ÉDITEUR. Prentice-Hall Press, Upper Saddle River, New Jersey.

MATSOUMOTO, M., PARK, J. AND T. YAMADA (1987). Gastrin receptor characterization :Affinity cross-linking of the gastrin receptor on canine gastric parietal cells. *Am. J. Physiol.* 252 :G143-G147.

MIYAKE, A. (1995). A truncated isoform of human CCK-B/gastrin receptor generated by alternative usage of a novel exon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208 :230-237.

MIYASAKA, K., GUAN, D., LIDDLE, R.A. AND G.M. GREEN (1989a). Feedback regulation by trypsin :evidence for intraluminal CCK-releasing peptide. *Am. J. Physiol.* 257 :G175-G181.

MIYASAKA, K, NAKAMURA, R. AND K. KITANI (1989b). Effect of trypsin inhibitor (camostat) on pancreas and CCK release in young and old female rats. *J. Gerontol. Medical Sci.* 44 :M136-M140.

MIYASAKA, K., KANAI, S., OHTA, M., KAWANAMI, T., KONO, A. AND A. FUNAKOSHI (1994). Lack of satiety effect of cholecystokinin (CCK) in a new rat model not expressing the CCK-A receptor gene. *Neurosci. Letters* 180 :143-146.

MIYASAKA, K., OHTA, M., MASUDA, M., KAWANAMI, T., MATSUMOTO, M. AND A. FUNAKOSHI (1995). Age-related changes in gene expression of central and peripheral cholecystokinin (CCK) and its receptors in rats. Biomed. Res. 16 :337-343.

MIYASAKA, K., OHTA, M., KANAI, S., SATO, Y., MASUDA, M. AND A. FUNAKOSHI (1996). Rôle of cholecystokinin (CCK)-A receptor for pancreatic growth after weaning :a study in a new model without gene expression of the CCK-A receptor. Pancreas 12 :351-356.

MIYASAKA, K., MASUDA, M. AND A. FUNAKOSHI (1997a). Regulation of cholecystokinin release and transcription in a rat without gene expression of cholecystokinin-A receptor. Digestion 58 :104-110.

MIYASAKA, K., OHTA, M., MASUDA, M. AND A. FUNAKOSHI (1997b). Retardation of pancreatic regeneration after partial pancreatectomy in a strain of rats without CCK-A receptor gene expression. Pancreas 14 :391-399.

MIYASAKA, K., SHINOZAKI, H., SUZUKI, S., SATO, Y., KANAI, S., MASUDA, M., JIMI, A., NAGATA, A., MATSUI, T., NODA, T., KONO, A. AND A. FUNAKOSHI (1999). Disruption of cholecystokinin (CCK)-B receptor gene did not modify bile or pancreatic secretion or pancreatic growth :a study in CCK-B receptor gene knockout mice. *Pancreas* 19 :114-118.

MONSTEIN, H.J., NYLANDER, A.G., SALEHI, A., CHEN, D., LUNDQUIST, I. AND R. HAKANSON (1996). Cholecystokinin-A and cholecystokinin-B/gastrin receptor mRNA expression in the gastrointestinal tract and pancreas of the rat and man. A polymerase chain reaction study. *Scand. J. Gastroenterol.* 31 :383-390.

MORISSET, J., GENIK, P., LORD, A., AND T.E. SALOMON (1982). Effects of chronic administration of somatostatin on rat exocrine pancreas, *Regul. Pept.* 4 :49-58.

MORISSET, J. (1984). Somatostatin : a potential antigrowth factor for the exocrine pancreas. *Regul. Pept.* 10 :11-22.

MORISSET, J. (1989). Gastrointestinal receptors in gut : Localization, characterization, modulation and ontogeny. E. LEBENTHAL ÉDITEUR. Lippincott-Raven. *Human Gastrointestinal Development* 4 :99-121.

MORISSET, J., LENEVEZ, F., CORRING, T., BENREZZAK, O., PELLETIER, G. AND E. CALVO (1996). Pig pancreatic acinar cells possess predominantly CCK-B receptor subtype. *Am. J. Physiol.* 271 :E397-E524.

MORISSET, J., LAINÉ, J. AND T. MIMÉAU-WORTHINGTON (1999). Hormonal control of rat fetal pancreas development. *Biol. Neonate* 75 :327-336.

MORISSET, J., WONG, H., WALSH, J.H., LAINÉ, J. AND J. BOURASSA (2000). The pancreatic CCK<sub>B</sub> receptors : their potential roles in somatostatin release and delta cells proliferation. *Am. J. Physiol.* 279 :G148-G156.

MUTT, V. AND J.E. JORPES (1968). Structure of porcine cholecystokinin pancreozymin 1- cleavage with thrombin and trypsin. *Eur. J. Biochem.* 6 :156-162.

MUTT, V. (1994) Historical perspectives on cholecystokinin research. *Annals of the New York Academy of Sciences*. BOLKAND, B., CULLONAN, J. ET A.C. FINK ÉDITEURS. The New York Academy of Sciences, New York. 1-110.

NAGATA, A., ITO, M., IWATA, N., KUNO, J., TAKANA, H., MINOWA, O., CHIHARA, K., MATSUI, T. AND T. NODA (1996). G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. 93 :11825-11830.

NAKATA, H., MATSUI, T., ITO, M., TANIGUCHI, T., NARIBAYASHI, Y., ARIMA, N., NAKAMURA, A., KINISHITA, Y., CHIHARA, K., HOSODA, S. AND T. CHIBA (1992). Cloning and characterization of gastrin receptor from ECL carcinoid tumor of *Mastomys natalensis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 187 :1151-1157.

NICKE, B., TSEND, M.-J., FENRICH, M.C. AND C.D. LOGSDON (1999). Adenovirus-mediated gene transfer of RasN17 inhibits specific CCK actions on pancreatic acinar cells. Am. J. Physiol. 276 :G499-G506.

NISHIMORI, I., KAMAKURA, M., FUJIKAWA-ADACHI, K., NOJIMA, M., ONISHI, S., HOLLINGSWORTH, M.A. AND A. HARRIS (1999). Cholecystokinin A and B receptor mRNA expression in human pancreas. Pancreas 19 :109-113.

NOMOTO, S., MIYAKE, M., OHTA, M., FUNAKOSHI, A. AND K. MIYASAKA (1999). Impaired learning and memory in OLETF rats without cholecystokinin (CCK)-A receptor. *Physiol. Behav.* 66 :869-872.

OIRY,C., GALLEYRAND, J.C., LIMA-LEITE, A.C., FULCRAND, P. AND J. MARTINEZ (1995). Are C-terminal octapeptide of cholecystokinin and [Leu<sup>11</sup>]gastrin-(5-17) different in stimulation of acid secretion in isolated rabbit gastric glands? *Eur. J. Pharmac.* 294 :511-519.

OKUMURA, T., SHOJI, E., ONODERA, S. AND Y. KOHGO (1996). Susceptibility to the development of gastric mucosal damage in OLETF rat not expressing the CCK-A receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 :728-733.

ORCI, L. (1982). Macro- and Micro-Domains in the Endocrine Pancreas. *Diabetes* 31 :538-565.

OWYANG, C AND J. WILLAMS (1991). Pancreatic secretion. *Textbook of Gastroenterology*. YAMADA, T., ALPERS, D.H., OYANG, C., POWELL ET F.E. SILVERSTEIN ÉDITEURS. New York, Lippincott. Pp. 294-313.



OWYANG, C. (1996). Physiological mechanisms of cholecystokinin action on pancreatic secretion. *Am. J. Physiol.* 271 :G1-G7.

PANDOL, S.J. (1998). Pancreatic physiology and testing. *Gastrointestinal and liver Disease*. FELDMAN, M., SCHARSCHMIDT, B.F. ET M.H. SLEISENGER ÉDITEURS. Philadelphie. Pp. 771-782.

PAVLOV, I.P. (1955). Typologie et pathologie de l'activité nerveuse supérieure : vingt ans d'expérience sur l'étude objective de l'activité supérieure des animaux. Paris : Presses Universitaire de France éditeur.

PEARSON, R.K. AND L.J. MILLER (1987). Affinity labeling of a novel cholecystokinin-binding in rat pancreatic plasmalemma using new short probes for the receptor. *J. Biol. Chem.* 262 :869-876.

PHILIPPE, C., LHOSTE, E.F., DUFRESNE, M., MORODER, L., CORRING, T. AND D. FOURMY (1997). Pharmacological and biochemical evidence for the simultaneous expression of CCKB/gastrin and CCKA receptors in pig pancreas. *Brith. J. Pharmacol.* 120 :447-454.

PIERZYNOWSKI, S.G., MATENSSON, H., WESTROM, B.R., AHREN, B., UVNAS MOBERG, K. AND B.W. KARLSSON (1993). Cholecystokinin (CCK33) can stimulate pancreatic secretion by local intestinal mechanism in the pig. Biomed.Res. 14 :217-221.

PISEGNA, J.R., DE WEERTH, A., HUPPI, K. AND S.A. WANK (1992). Molecular cloning of the human brain and gastric cholecystokinin receptor :structure, fonctional expression and chromosomal localization. Biochem. Biophys. Res. Commun. 189 :296-303.

POVOSKI, S.P., ZHOU, W., LONGNECKER, D.S. AND H.B. BELL (1994). Novel expression of gastrin (CCK-B) receptors in pancreatic carcinomas and dysplastic pancreas from transgenic mice. Am. J. Surgery 167 :120-128.

POWELL, C.T., NEY, C., ARAN, P. AND K. AGARWAL (1985). A gastrin gene is expressed in both porcine pituitary, and antral mucosal tissues. Nucleic Acids Res. 13 :7299-7305.

PRAISSMAN, M., BRAND, D.L., PRAISSMAN, L.A., WALDEN, M., FAY, M.E., LANE, B.P., MANONKIAN, A. AND Y.-M. LU (1998). Autoradiographic identification of a gastrin receptor on the human parietal cell. *Regul. Peptides* 73 :183-190.

PRINZ, C., SCOTT, D.R., HURWITZ, D., HELANDER, H.F. AND G. SACHS (1994). Gastrin effects on isolated rat enterochromaffin-like cells in primary culture. *Am. J. Physiol.* 267 :G663-G675.

QIAN, J.-M., ROWLEY, W.H. AND R.T. JENSEN (1993). Gastrin and cholecystokinin activate phospholipase C and stimulate pepsinogen release by interacting with two distinct receptors. *Am. J. Physiol.* 264 :G718-G728.

RAUFMAN, J.-P. (1992). Gastric chief cells :receptors and signal-transduction mechanisms. *Gastroenterology* 102 :699-710.

REAGENT, J.E., ROBINSON, J.L., LOTTI, V.J. AND M.E. GOLFINE (1987). Fasting and L-364,718 prevent cholecystokinin-induced elevations of plasma insuline levels. *Eur. J. Pharmacol.* 144 :241-243.

REHFELD, J.F., LARSSON, L.I., GOTTERMANN, N.R., SCHWARTZ, T.W., HOLST, J.J., JENSEN, S.L. AND J.S. MORLEY (1980). Neural regulation of pancreatic hormone secretion by the C-terminal tetrapeptide of CCK. *Nature (Lond.)* 284 :33-38.

REHFELD, J.F. AND W.W. VAN SOLINGE (1994). The tumour biology of gastrin and cholecystokinin. *Adv. Cancer Res.* 63 :295-347.

REIDELBERGER, R.P. (1994). Cholecystokinin and control of food intake. *Am. J. Nutr.* 124 :13275-13335.

REUBEN, M., RISING, L., PRINZ, C., HERSEY, S. AND G. SACHS (1994). Cloning and expression of rabbit gastric CCK-A receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219 :321-327.

REUBI, J.C., WASER, B., LÄDERACH, U., STETTLER, C., FRIESS, H., HALTER, F. AND A. SCHMASSMANN (1997). Localization of cholecystokinin A and cholecystokinin B receptors in human stomach. *Gastroenterology* 112 :1197-1205.

RIVARD, N., GUAN, D., MAOUIYO, G., GRONDIN, G., BÉRUBÉ, F.L. AND J. MORISSET (1991). Endogenous cholecystokinin release responsible for pancreatic growth after pancreatic juice diversion. *Endocrinology* 129 :2867-2874.

ROCHE, S., BALI, J.-P. AND R. MAGOUS (1990). Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein in the action of gastrin on gastric parietal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1055 :287-294.

ROUILLER, D., SCHUSDZIARRA, V., HARRIS, V. AND R.H. UNGER (1980). Release of pancreatic and gastric somatostatin-like immunoreactivity in response to the octapeptide of cholecystokinin, secretin, gastric inhibitory polypeptide, and gastrin 17 in dogs. *Endocrinology* 107 :524-529.

SAILLAN-BARREAU, C., CLERC, P., ADATO, M., ESCRIEUT, C., VAYSSE, N., FOURMY, D. AND M. DUFRESNE (1998). Transgenic CCK-B/gastrin receptor mediates murine exocrine pancreatic secretion. *Gastroenterology*. 115 :988-996.

SAILLAN-BARREAU, C., DUFRESNE, M., CLERC, P., SANCHEZ, D., COROMINOLA, H., MORISCOT, C., GUY-CROTTE, O., ESCRIEUT, C., VAYSSE, GOMIS, R., TARASOVA, N. AND D. FOURMY (1999). Evidence for a functional role of the cholecystokinin-B/Gastrin in the human fetal and adult pancreas. *Diabetes* 48 :2015-2021.

SAKAMOTO, C., GOLDFINE, I.D., ROACH, E AND J.A. WILLIAMS (1985). Localization of saturable CCK binding sites in rat pancreatic islets by light and electron microscope autoradiography. *Diabetes* 34 :390-394.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. AND T. MANIATIS (1989). *Molecular cloning : A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.

SANDVIK, A.K., WALDUM, H.L., KLEVELAND, P.M. AND B. SCHULZESOGNEN (1987). Gastrin produces an immediate and dose-dependent histamine release preceding acid secretion in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. *Scand. J. Gastroenterol.* 22 :803-810.

SANDVIK, A.K. AND H.L. WALDUM (1991). CCK-B (gastrin) receptor regulates gastric histamine release and acid secretion. *Am. J. Physiol.* 260 :G925-G928.

SANKARAN, H., GOLDFINE, I.D., BAILEY, A., LICKO, V. AND J.A. WILLIAMS (1980). Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 242 :G250-G257.

SARFATI, P. AND J. MORISSET (1989). Regulation of pancreatic enzyme secretion in conscious rats by intra-luminal somatostatin; mechanism of action. *Endocrinology* 124 :2406-2414.

SCHÄFER, C., ROSS, S.E., BRAGADO, M.J., GROBLEWSKI, G.E., ERNST, S.A. AND J.A. WILLIAMS (1998). A role of p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* 273 :24173-24180.

SETHI, T. AND E. ROZENGURT (1992). Gastrin modulates  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and clonal growth in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 52 :6031-6035.

SETHI, T., HERGET, T., WU, S.V., WALSH, J.H. AND E. ROZENGURT (1993).  $\text{CCK}_A$  et  $\text{CCK}_B$  receptors are expressed in small cell lung cancer lines and mediate  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and clonal growth. *Cancer Res.* 53 :5208-5213.

SEUFFERLEIN, T., WITHERS, D.J., BROAD, S., HERGET, T., WALSH, J.H. AND E. ROZENBURT (1995). The human CCK<sub>B</sub>/gastrin receptor transfected into rat fibroblasts mediates activation of MAP kinase, p74<sup>raf</sup> kinase and mitogenesis. *Cell Growth Differen.* 6 :383-393.

SEVA, C., DICKINSON, C.J. AND T. YAMADA (1994). Growth-promoting effects of glycine-extended progastrin. *Science* 265 :410-412.

SHETZLINE, M.A. AND R.A. LIDDLE (1998b). Neurohumoral control of the exocrine pancreas. *Gastroenterology* 12 :423-428.

SHOJI, E., OKUMURA, T. AND Y. KOHGO (1996) Intraduodenal lipid does not inhibit acid secretion in OLETF rats not expressing CCK-A receptor gene. *Digest. Dis. Sci.* 41 :2174-2179.

SHOJI, E., OKUMURA, T., ONODERA, S., TAKAHASHI, N., HARADA, K. AND Y. KOHGO (1997). Gastric emptying in OLETF rats not expressing CCK-A receptor. *Digest. Dis. Sci.* 42 :915-919.

SHULKES, A. AND G.S. BALDWIN (1997). Biology of gut cholecystokinin and gastrin receptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24 :209-216.



SILVENTE POIROT, A., ESCRIEUT, C., DUFRESNE, M., MARTINEZ, J., BOUISSON, M., VAYSSE, N AND D. FOURMY (1994). Photoaffinity labeling of rat pancreatic cholecystokinin type A receptor antagonist binding sites demonstrates the presence of a truncated cholecystokinin type A receptor. Mol. Pharm. 45 :599-607.

SINGER, M.V., SOLOMON, T.E. AND M.I. GROSSMAN (1980a). Effect of atropine on secretion from intact and transplanted pancreas in dog. Am. J. Physiol. 238 :G18-G22.

SINGER, M.V., SOLOMON, T.E., WOOD, J. AND M.I. GROSSMAN (1980b). Latency of pancreas response to intraduodenal stimulants. Am. J. Physiol. 238 :G23-G29.

SINGH, P., OWLIA, A., ESPEIJO, R. AND B. DAI (1995). Novel gastrin receptors mediate mitogenic effects of gastrin and processing intermediates of gastrin on Swiss 3T3 fibroblasts. Absence of detectable cholecystokinin (CCK)-A and (CCK)-B receptors. J. Biol. Chem. 270 :8429-8438.

SLACK, J.M.W. (1995). Developmental biology of the pancreas. Development 121 :1569-1580.

SMITH, J.P., FANTASKEY, A.P., LIU, G. AND I.S. ZAGON (1995). Identification of gastrin as a growth peptide in human pancreatic cancer. Am. J. Physiol. 268 :R135-R141.

SMITH, J.P., VERDERAME, M.F., MCLAUGHLIN, P.J. AND I.S. ZAGON (1999). Characterization of the CCK-C receptor in human pancreatic cancer. Digestion 60 :122.

SOLL, A.H. (1980). Secretagogue stimulation of [ $^{14}\text{C}$ ] aminopyrine accumulation by isolated canine parietal cells. Am. J. Physiol. 238 :G366-G375.

SOLL, A.H., AMIRIAN, D.A., THOMAS, L.P., REEDY, T.J. AND J.D. ELASHOFF (1984) Gastrin receptor on isolated canine parietal cells. J. Clin. Invest. 73 :-1434-1440.

SONG, I., BROWN, D.R., WILTSHIRE, R.N., GANTZ, I., TRENT, J.M. AND T. YAMADA (1993). The human gastrin/cholecystokinin type B receptor gene : Alternative splice donor site in exon 4 generates two variant mRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. 90 :9085-9089.

SOUDAH, H., LU, Y., HASLER, W.L. AND C. OWYANG (1992). Cholecystokinin at physiological levels evokes pancreatic enzyme secretion via a cholinergic pathway. *Am. J. Physiol.* 263; 26 :G102-G107.

SUN, G., CHANG, T.M., XUE, W., WEY, J.F.Y., LEE, K.Y. AND W.Y. CHEY (1992). Release of cholecystokinin and secretin by sodium oleate in dogs :molecular form and bioactivity. *Am. J. Physiol.* 262 :G35-G43.

TAKIGUCHI, S., TAKATA, Y., TAKAHASHI, N., KATAOKA, K., HIRASHIMA, T., KAWANO, K., MIYASAKA, K., FUNAKOSHI, A. AND A. KONO (1998). A disrupted cholecystokinin A receptor gene induced diabetes in obese rats synergistically with ODB1 gene. *Am. J. Physiol.* 274 :E265-E270.

TALKAD, V.D., FORTUNE, K.P., POLLO, D.A., SHAH, G.N., WANK, S.A. AND J.D. GARDNER (1994). Direct demonstration of three different states of the pancreatic cholecystokinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 :1868-1872.

TANG, C., BIEMOND, I. AND C.B. LAMERS (1996). Cholecystokinin receptor in human pancreas and gallbladder muscle :a comparative study. *Gastroenterology* 111 :1621-1626.

TANIGUCHI, T., MATSUI, T., ITO, M., MURAYAMA, T., TSUKAMOTO, T., KATAKAMI, Y., CHIBA, T. AND K. CHIHARA (1994). Cholecystokinin-B/gastrin receptor signaling pathway involves tyrosine phosphorylations of p125<sup>FAK</sup> and p42<sup>MAP</sup>. *Oncogene* 9 :861-867.

TOWNSEND, C.M. Jr., BEAUCHAMP, R.D., SINGH, P. AND J.C. THOMPSON (1988). Growth factors and intestinal neoplasms. *Am. J. Physiol.* 155 :526-536.

TULASSAY, Z. (1998). Somatostatine and the gastrointestinal tract. *Scand J. Gastroenterol.* 228 :115-121.

TULLIO, P., DELARGE, J. AND B. PIROTTE (1999). Recent advances in the chemistry of cholecystokinin receptor ligands (agonists and antagonists). *Cur. Med. Chem.* 6 :433-455.

ULRICH, CD., FERBER, I., HOLICKY, E., HADA, E., BUELL, G. AND L.J. MILLER (1993). Molecular cloning and functional expression of the human gallblader cholecystokinin A receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193 :204-211.

UVNAS-WALLENSTEN, K., REHFELD, J.F., LARSSON, L.I. AND B. UVNAS (1977). Heptadecapeptide gastrin in the vagal nerve. Proc. Natl. Acad. Sci. 74 :5707-5710.

VAN SOLINGE, W.W., NIELSON, F.C., FRIIS-HANSEN, L., FALKMER, U.G., AND J.F. FEHFELD (1993). Expression but incomplete maturation of progastrin in colorectal carcinomas. Gastroenterology 104 :1099-1107.

VARRO, A., VORONINA, S. AND G.J. DOCKRAY (1995). Pathways of processing of the gastrin precursor in rat antral mucosa. J. Clin. Invest. 95 :1642-1649.

VERSPOHL, E.J. AND H.P.T. AMMON (1987). Cholecystokinin (CCK-8) regulates glucagon, insulin, and somatostatin secretion from isolated rat pancreatic islets : interaction with glucose. Pflugers Arch 410 :284-287.

VERSPOHL, E.J., HAFNER, B., HE, X. AND J.J. KNITTEL (1994). Evidence for cholecystokinin receptor subtype in endocrine pancreas. Peptides 15 :1353-1360.

WAGNER, A.C.C., METZZLER, W., HÖFKEN, T., WEDER, H. AND B. GÖKE (1999). P38 MAP kinase is expressed in the pancreas and is immediately activated following cerulein hyperstimulation. *Digestion* 60 :41-47.

WALSH, J.H. (1994). *Gastrointestinal hormones. Physiology of the gastrointestinal tract.* JOHNSON, L.R., CHRISTENSEN, J., JACKSON, J.M., JACOBSON, E.D. AND J.H. WALSH ÉDITEURS. New York, Raven Press.

WANG, H.-Y., KINOSHITA, Y., HASSAN, M.S., MATSUSHIMA, Y., FUKUI, H., MAEKAWA, T., OKADA, A., WAKI, S., KAWANAMI, C., KISHI, K., WATANABE, M., MAEDA, S. AND T. CHIBA (1997). Developmental gene expression of gastrin receptor in rat stomach. *Reg. Pept.* 70 :183-189.

WANK, S.A., HARKINS, R., JENSEN, R.T., SHAPIRA, H., DE WEERTH, A. AND T. SLATTERY (1992a). Purification, molecular cloning, and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 :3125-3129.

WANK, S.A., PISEGNA, J.R., AND A. DE WEERTH (1992b). Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family : structure and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 :8691-8695.

WANK, S.A., PISEGNA, J.R. AND A. DE WEERTH (1994). Cholecystokinin receptor family :molecular cloning, structure and functional expression in rat, guinea pig and human. Ann. NY Acad. Sci. 713 :49-66.

WATSON, S.A., DURRANT, L.G. CROSBIE, J.D. AND D.L. MORRIS (1989a). The in vitro growth response of primary human colorectal and gastric cancer cells to gastrin. Int. J. Cancer 43 :692-696.

WATSON, S.A., DURRANT, L. AND D. MORRIS (1989b). Gastrin : growth enhancing effects on human gastric and colonic tumour cells. Br. J. Cancer. 59 :554-558.

WILLIAMS, J.A. AND G.T. JR BLEVINS (1993). Cholecystokinin and regulation of pancreatic acinar cell fonction. Physiol. Rev. 73 :701-723.

WILLIAMS, J.A. (1997). Pancreatic acinar cell intracellular signaling mechanisms. Curr. Opin. Gastroenterol. 13 :369-374.

XU, X., CROY, J.T., ZENG, W., ZHAO, L., DAVIGNON, I., POPOV, S., YU, K., JIANG, H., OFFERMANN, S., MUALLEM, S. AND T.M. WILKIE. (1998). Promiscuous coupling of receptors to  $G_q$  class  $\alpha$  subunits and effector proteins in pancreatic and submandibular gland cells. *J. Biol. Chem.* 273 :27275-27279.

YU, D.-H., HUANG, S.C., WANK, S.A., MANTEY, S., GARDNER, J.D. AND R.T. JENSEN (1990). Pancreatic receptors for cholecystokinin :Evidence for three receptor classes. *Am. J. Physiol.* 258 :G86-G95.

YULE, D.I., BAKER, C.W. AND J.A. WILLIAMS (1999). Calcium signaling in rat pancreatic acinar cells :a rôle for  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{11}$  and  $G\alpha_{14}$ . *Am. J. Physiol.* 276 :G271-G279.

ZAVROS, Y. AND A. SHULKES (1997). Cholecystokinin (CCK) regulates somatostatin secretion through both the CCK-A and CCK-B/gastrin receptors in sheep. *J. Physiol.* 505 :811-821.

ZAVROS, Y., FLEMING, W.R., HARDY, K.J. AND A. SHULKES (1998). Regulation of fundic and antral somatostatin secretion by CCK and gastrin. *Am. J. Physiol.* 274 :G742-G750.



ZAWALICH, W.S., DIAZ, V.A. AND K.C. ZAWALICH (1988). Stimulatory effects of cholecystokinin on isolated perfused islets inhibited by potent and specific antagonist l-364,718. *Diabetes* 37 :1432-1437.

ZEYTIN, F.N., RUSK, S.F. AND R. DELELLIS (1988). Growth hormone-releasing factor and fibroblast growth factor regulate somatostatin gene expression. *Endocrinology* 122 :1133-1136.

ZHOU, W., POVOSKI, S.P. AND R.H. BELL (1993). Overexpression of messenger RNA for cholecystokinin-A receptor and novel expression of messenger RNA for gastrin (cholecystokinin-B) receptor in azaserine-induced rat pancreatic carcinoma. *Carcinogenesis* 14 :21189-2192.

ZHOU, W., POVOSKI, S.P. AND R.H. BELL (1995). Characterization of cholecystokinin receptors and messenger RNA expression in rat pancreas :evidence for expression of cholecystokinin-A but not cholecystokinin-B (gastrin) receptors. *J. Surg. Res.* 58 :281-289.